



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DA CARGA VIRAL DO CORONAVÍRUS FELINO E SUA RELAÇÃO COM O  
PERFIL DE EXPRESSÃO DE MEDIADORES IMUNITÁRIOS, EM ANIMAIS PORTADORES  
E COM PERITONITE INFECCIOSA

FILIPA DE MELO GAGO VASSALO E SILVA

**CONSTITUIÇÃO DO JÚRI**

Doutor Luís Manuel Morgado Tavares

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Dr.<sup>a</sup> Beatriz Libório Sinogas

**ORIENTADORA**

Dr.<sup>a</sup> Beatriz Libório Sinogas

**CO-ORIENTADORA**

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

2013

LISBOA

---





UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DA CARGA VIRAL DO CORONAVÍRUS FELINO E SUA RELAÇÃO COM O  
PERFIL DE EXPRESSÃO DE MEDIADORES IMUNITÁRIOS, EM ANIMAIS PORTADORES  
E COM PERITONITE INFECCIOSA

FILIPA DE MELO GAGO VASSALO E SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**CONSTITUIÇÃO DO JÚRI**

Doutor Luís Manuel Morgado Tavares

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Dr.<sup>a</sup> Beatriz Libório Sinogas

**ORIENTADORA**

Dr.<sup>a</sup> Beatriz Libório Sinogas

**CO-ORIENTADORA**

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

2013

LISBOA

---

*Aos meus pais e irmã,*

## **Agradecimentos**

À minha orientadora, Dr.<sup>a</sup> Beatriz Sinogas, por todo o acompanhamento e amizade de há tanto tempo e pelo gosto, sempre evidente, em partilhar comigo os seus conhecimentos clínicos.

À Professora Ana Duarte, pela co-orientação que foi fundamental em todos os passos da elaboração da presente tese e pela disponibilidade que sempre demonstrou para me auxiliar, ensinar e esclarecer.

Ao Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA) pela disponibilização de meios materiais e financeiros que permitiram a realização deste trabalho.

Ao Dr. Carlos Rito, por me ter aberto as portas das suas clínicas com toda a simpatia e entusiasmo. À equipa da Clínica Veterinária da Pontinha, Vanessa Borges e Sara Carvalho, por me terem ajudado sempre que necessário.

Aos que me acompanharam na parte laboratorial que viria a dar origem ao presente trabalho, Clara Cartaxeiro, Rodolfo Leal, Solange Gil e Joana Dias, por toda a companhia, boa disposição e partilha de conhecimentos. E ainda a todos os que se dispuseram a esclarecer as minhas dúvidas nos vários laboratórios da FMV.

Ao Dr. Telmo Nunes, Beatriz Goulão e Patrícia Pascoal pela fundamental ajuda e paciência na parte estatística do trabalho. Ainda com a estatística e muito mais, um imenso obrigada à Marta Elias.

Aos meus amigos de sempre, aos que apareceram e ficaram, aos que foram aparecendo e têm ficado, um especial agradecimento por toda a partilha, apoio e diversão.

Aos meus pais, pelo exemplo e pela formação, pela paciência e apoio incansável. À minha irmã por toda a amizade e acompanhamento. Aos outros elementos da família pela amizade e interesse nos meus percursos académicos.

Ao Toy, Hippie e Bug pela inspiração diária.

### **Avaliação da carga viral do Coronavírus felino e sua relação com o perfil de expressão de mediadores imunitários, em animais portadores e com Peritonite Infecciosa**

A infecção pelo coronavírus felino (FCoV) em gatos, não só leva à excreção do vírus após infecção intestinal mas também à infecção sistêmica, podendo manter-se assintomática ou manifestar-se como Peritonite Infecciosa Felina (PIF), uma doença fatal. Estima-se que 80 a 90% da população felina esteja infectada por este vírus mas apenas 5 a 12% desenvolvem a doença. O FCoV divide-se em dois subtipos, o tipo I e o tipo II, sendo o primeiro o responsável pela maioria das infecções. A patogénese da doença é complexa e não é totalmente conhecida, não estando claramente identificado qual o papel do sistema imunitário no seu estabelecimento e manutenção. Considera-se que uma forte resposta imunitária celular pode prevenir a doença e, pelo contrário, que uma forte resposta imunitária humoral pode levar ao estabelecimento da doença, na sua forma exsudativa ou não exsudativa.

De forma a conhecer o perfil imunitário de animais naturalmente infectados pelo FCoV foram determinados os níveis de transcrição do mRNA das citocinas IL-10, IL-4, IL-12p35, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  em amostras de sangue dos animais em estudo, através de RTqPCR. Estes foram divididos em três grupos para comparação dos resultados: o primeiro sem sintomatologia associada a PIF (I); o segundo com sintomatologia gastrointestinal suspeita de PIF (II) e o terceiro com sintomatologia neurológica e ocular suspeita de PIF (III). Foi ainda realizada a subtipificação viral e determinada a carga viral em líquido de derrame e em zaragatoas rectais e/ou amostras de fezes, avaliando o nível de excreção viral destes animais na tentativa de associar ao perfil de citocinas.

Apesar da tentativa de realizar o estudo com grupos com a maior homogeneidade possível, observou-se muita variabilidade nos níveis de transcrição. A carga viral entre os três grupos revelou-se sem diferenças significativas pelo que fica por responder o seu efeito no desenvolvimento e manutenção da doença. Já nos perfis de citocinas, o TNF- $\alpha$  revelou-se inesperadamente elevado em animais naturalmente infectados e assintomáticos e diminuído nos dois grupos naturalmente infectados mas com sintomatologia suspeita de PIF. Os perfis da expressão de citocinas aparentemente demonstram uma resposta predominantemente celular nos grupos I e III e mista no grupo II, apesar de estatisticamente não se terem verificado diferenças entre os grupos.

Palavras-chave: Coronavírus felino, Peritonite Infecciosa Felina, carga viral, citocinas, perfil imunitário

## Abstract

---

### **Evaluation of feline coronavirus viral load and its relation with the expression profile of immune mediators on healthy carriers and on animals with Feline Infectious Peritonitis**

Infection with feline coronavirus (FCoV) in cats, not only leads to virus elimination on faeces after intestinal infection but also to systemic infection that may remain asymptomatic or manifest as Feline Infectious Peritonitis (FIP), a fatal disease. It is estimated that 80 to 90% of the cat population is infected with this virus, but only 5 to 12% develop the disease, one of the most important viral diseases in cats. FCoV can be divided into two types, type I and type II, the former being responsible for the majority of infections. The pathogenesis of the disease is complex and the role of the immune system in the establishment and maintenance of disease remains unclear. It is considered that a strong cellular immune response can prevent the disease, and, conversely, that a strong humoral immune response may lead to the establishment of the disease whether on in its exudative or non-exudative form.

In order to learn about the immune profile of naturally infected cats with FCoV, the mRNA transcription levels of IL-10, IL-4, IL-12p35, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  cytokines was measured by RTqPCR in blood samples. The animals were divided into three groups for comparison purposes: the first had no symptoms associated with PIF (I); the second had gastrointestinal symptoms suspected of FIP (II) and the third had ocular and neurologic symptoms suspected of FIP (III). Furthermore viral subtyping was performed and viral load was determined in effusions and in rectal swabs and/or faecal samples, assessing the level of viral shedding of these animals in an attempt to associate with the cytokine profile.

Despite the attempts to arrange the study groups with the greatest possible homogeneity, there was significative variability on the transcription levels. The viral load between the three groups revealed no significant differences, leaving the effect of viral load in the development and maintenance of the disease unanswered. The TNF- $\alpha$  profile proved unexpectedly high in naturally infected and asymptomatic cats and decreased in both naturally infected with suspected symptoms of FIP groups. The expression profiles of cytokines apparently show a predominantly cellular response in groups I and III and mixed in group II, although there have been no statistically differences between groups.

**Keywords:** Feline coronavirus, Feline Infectious Peritonitis, viral load, cytokines, immune profile

<b>I. Breve descrição das actividades realizadas no estágio curricular .....</b>	<b>1</b>
<b>II. Introdução .....</b>	<b>3</b>
1. Coronavírus felino.....	3
1.1. Taxonomia.....	3
1.2. Organização do genoma.....	3
1.2.1. Proteínas estruturais.....	4
1.2.1.1. A proteína da espícula ou proteína S.....	4
1.2.1.2. A proteína de membrana ou proteína M .....	5
1.2.1.3. A proteína do invólucro ou proteína E.....	5
1.2.1.4. A proteína da nucleocápside ou proteína N .....	5
1.2.2. Proteínas não estruturais.....	5
1.2.2.1. Poliproteína polimerase .....	5
1.2.2.2. Proteínas acessórias .....	5
1.3. Ciclo viral .....	6
1.3.1. Entrada na célula.....	6
1.3.2. Replicação e transcrição do genoma .....	6
1.3.3. Montagem viral .....	7
1.4. Transmissão entre espécies .....	8
1.5. Biótipos e serótipos do FCoV .....	8
2. Epidemiologia .....	9
2.1. Animais susceptíveis e prevalência .....	9
2.2. Factores de Risco.....	10
2.2.1. Idade dos animais .....	10
2.2.2. Número de indivíduos por recinto .....	10
2.2.3. Predisposição de raças puras.....	11
2.2.4. Imunossupressão e doenças concomitantes .....	11
2.2.5. Género dos animais.....	12
2.2.6. Sazonalidade.....	12
2.2.7. Stress .....	12
2.3. Transmissão .....	13
2.4. Infecção.....	13
2.5. Excreção viral .....	14
3. Patogénese .....	15
3.1. Tropismo do coronavirus felino .....	15
3.2. Teoria da mutação interna .....	15
3.2.1. Alterações no gene S .....	15
3.2.2. Alterações no gene 3c.....	16
3.2.3. Alterações nos genes 7a e 7b .....	16
3.2.4. Factores que facilitam a mutabilidade.....	17
3.3. Teoria da circulação de estirpes virulentas e avirulentas .....	17
3.4. Teoria das <i>quasispecies</i> .....	18
3.5. Entrada do vírus nos macrófagos .....	18
3.6. Replicação viral .....	19
3.7. Formação de anticorpos .....	20
3.8. Tecidos alvo .....	20
3.9. Formação da lesão .....	21
3.9.1. Características anatomopatológicas das lesões mais comuns .....	21
3.9.2. Características anatomopatológicas das lesões oculares e de SNC.....	22
4. Sinais clínicos .....	23
4.1. Forma húmida da PIF .....	23
4.2. Forma seca da PIF .....	24
4.3. Forma intestinal da PIF.....	25
5. Imunidade na PIF .....	25



5.1.	Imunidade passiva .....	25
5.2.	Imunidade activa.....	25
5.2.1.	Imunidade Humoral .....	26
5.2.2.	Imunidade Celular.....	27
5.2.2.1.	Padrões de expressão de citocinas na PIF .....	28
6.	Diagnóstico .....	31
6.1.	História clínica .....	31
6.2.	Hematologia .....	32
6.3.	Análises bioquímicas .....	32
6.3.1.	Hiperbilirrubinemia e enzimas hepáticas.....	32
6.3.2.	Hiperglobulinemia e <i>ratio</i> albumina-globulina.....	32
6.3.3.	Proteínas de fase aguda.....	33
6.4.	Análise do líquido de derrame .....	33
6.4.1.	Teste de Rivalta.....	34
6.5.	Análise do líquido cefalorraquidiano na PIF neurológica.....	34
6.6.	Anticorpos séricos e do líquido derrame .....	35
6.7.	Deteção de anticorpos no LCR .....	35
6.8.	Identificação do vírus por análise molecular .....	35
6.9.	Análise do humor aquoso .....	37
6.10.	Achados imagiológicos.....	37
6.11.	Histopatologia .....	37
6.11.1.	Imunofluorescência e imunohistoquímica .....	38
7.	Tratamento .....	39
7.1.	Tratamento imunossupressor .....	39
7.2.	Tratamento imunomodulador .....	40
7.3.	Tratamento antiviral .....	40
7.4.	Monitorização do tratamento e prognóstico .....	41
8.	Controlo e Maneio.....	41
8.1.	Ambiente com múltiplos gatos .....	41
8.2.	Gatis de reprodução .....	41
8.3.	Abrigos de recuperação.....	42
8.4.	Vacinação.....	42
<b>III.</b>	<b>Trabalho prático.....</b>	<b>45</b>
1.	Introdução/Objectivos .....	45
2.	Materiais e Métodos.....	46
2.1.	Caracterização da amostra (N=31) .....	46
2.2.	Recolha de amostras biológicas .....	46
2.3.	Processamento das amostras.....	46
2.4.	Extracção de ácido nucleico .....	46
2.5.	Quantificação viral de FCoV .....	47
2.6.	Subtipificação de FCoV .....	48
2.7.	Síntese de cDNA .....	50
2.8.	qPCR.....	50
2.9.	Quantificação relativa da transcrição das citocinas.....	52
2.10.	Análise estatística .....	52
<b>IV.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>55</b>
1.	Caracterização da amostra .....	55
1.1.	Caracterização do Grupo I .....	55
1.2.	Caracterização do Grupo II .....	56
1.3.	Caracterização do Grupo III .....	56
2.	Análise clínica dos diferentes grupos.....	56
3.	Quantificação viral de FCoV .....	58
4.	Subtipificação das amostras rectais e de líquido de derrame.....	59
5.	Quantificação relativa de IL-10, IL-4, IL-12p35, IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ nos grupos I, II e III .....	60
5.1.	Comparação da quantificação relativa da IL-10 nos grupos clínicos I, II e III .....	60
5.2.	Comparação da quantificação relativa da IL-4 nos grupos clínicos I, II e III .....	61
5.3.	Comparação da quantificação relativa da IL-12p35 nos grupos clínicos I, II e III .....	61

5.4.	Comparação da quantificação relativa do IFN- $\gamma$ nos grupos clínicos I, II e III.....	62
5.5.	Comparação da quantificação relativa do TNF- $\alpha$ nos grupos clínicos I, II e III .....	62
6.	Resultados da comparação da medição de citocinas dos grupos I, II e III .....	63
7.	Resultados da correlação entre citocinas e entre cada citocina e carga viral .....	64
<b>V.</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>65</b>
4.1.	Comparação da quantificação relativa da IL-10 nos grupos clínicos I, II e III .....	70
4.2.	Comparação da quantificação relativa da IL-4 nos grupos clínicos I, II e III .....	71
4.3.	Comparação da quantificação relativa da IL-12p35 nos grupos clínicos I, II e III ...	72
4.4.	Comparação da quantificação relativa do IFN- $\gamma$ nos grupos clínicos I, II e III.....	73
4.5.	Comparação da quantificação relativa do TNF- $\alpha$ nos grupos clínicos I, II e III .....	74
5.	Correlação entre citocinas e entre cada citocina e carga viral .....	75
6.	Considerações finais .....	76
<b>VI.</b>	<b>Conclusão .....</b>	<b>77</b>
<b>VII.</b>	<b>Bibliografia.....</b>	<b>78</b>



## Índice de Figuras

Figura nº 1 - Modelo da estrutura do coronavírus .....	3
Figura nº 2 - Representação do genoma de coronavírus felino .....	4
Figura nº 3 – Modelo da transcrição da proteína M do coronavírus. ....	7
Figura nº 4 – Esquema do RT-PCR para distinção dos tipos I e II de FCoV. ....	49
Figura nº 5 – Produtos da subtipificação por RT-PCR, mostrando a amplificação de 6 amostras biológicas em gel de agarose a 2% .....	59

## Índice de Tabelas

Tabela nº 1 - Resumo das áreas abordadas durante o estágio em clínica, dividido pelas espécies canina, felina e NACs (novos animais de companhia). ....	1
Tabela nº 2 – Resumo das cirurgias observadas durante o período do estágio curricular em clínica. ....	2
Tabela nº 3 – <i>Primers</i> e sonda utilizados no RTqPCR para diagnóstico e quantificação viral de FCoV e dimensão do fragmento obtido. ....	48
Tabela nº 4 – Ciclos térmicos utilizado no protocolo de quantificação viral em RTqPCR. ...	48
Tabela nº 5 – <i>Primers</i> , posição no genoma e tamanho do fragmento originado, utilizados no RT-PCR para subtipificação de FCoV. ....	49
Tabela nº 6 – Ciclos térmicos utilizados no protocolo RT-PCR para subtipificação de FCoV. ....	50
Tabela nº 7 – <i>Primers</i> utilizados na medição da expressão da transcrição de citocinas e dimensão do fragmento amplificado. ....	51
Tabela nº 8 – Ciclo térmico utilizado no protocolo qPCR com <i>SYBR® Green</i> . ....	52
Tabela nº 9 – Distribuição da idade e género por animal em estudo (n=15). ....	56

## Índice de Gráficos

Gráfico nº 1 – Frequência etária dos animais incluídos no estudo por intervalos etários (N=31). ....	55
Gráfico nº 2 – Alterações clínicas gerais observadas nos animais (n=15) que integram o estudo, divididos por grupos clínicos. ....	57
Gráfico nº 3 – Alterações analíticas de hemograma e bioquímicas observadas nos animais (n=15) que integram o estudo, divididos por grupos clínicos. ....	57
Gráfico nº 4 – Distribuição descritiva da medição da carga viral das amostras biológicas (n=15) por grupo clínico (I, Portadores; II, Gastrointestinal; III, Ocular/SNC).. ....	58
Gráfico nº 5 – Frequência dos resultados da subtipificação viral das amostras rectais e/ou fezes e de líquido de derrame da amostra inicial (n= 35) .....	59

Gráfico nº 6 – Subtipificação após divisão por grupos clínicos (n= 15).....	60
Gráfico nº 7 – Distribuição dos resultados da quantificação relativa do mRNA da citocina IL-10 nos diferentes grupos clínicos. ....	60
Gráfico nº 8 – Distribuição dos resultados da quantificação relativa do mRNA da citocina IL-4 nos diferentes grupos clínicos. ....	61
Gráfico nº 9 – Distribuição dos resultados da quantificação relativa do mRNA da citocina IL-12p35 nos diferentes grupos clínicos. ....	61
Gráfico nº 10 – Distribuição dos resultados da quantificação relativa do mRNA da citocina IFN- $\gamma$ nos diferentes grupos clínicos. ....	62
Gráfico nº 11 – Distribuição dos resultados da quantificação relativa do mRNA da citocina TNF- $\alpha$ nos diferentes grupos clínicos. ....	62
Gráfico nº 12 – Gráficos caixa-de-bigodes dos níveis de expressão das citocinas IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-12p35, TNF- $\alpha$ e IL-4 em cada grupo. ....	63
Gráfico nº 13 – Matriz de correlação entre os níveis de expressão entre as citocinas IL-10, IL-4, IL-12p35, IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ e entre cada citocina referida e a carga viral, no qual as rectas representam a relação entre os pares de variáveis. ....	64

## Lista de abreviaturas

---

ADEI	<i>Antibody – dependent enhancement of infectivity</i>
A:G	<i>Ratio albumina-globulina</i>
AGP	Glicoproteína ácida $\alpha$ -1
ALP	<i>Alkaline phosphatase</i> (Fosfatase alcalina)
ALT	Alanina aminotransferase
APN	N-aminopeptidase
APP	<i>Acute phase protein</i> (Proteína de fase aguda)
B2M	$\beta$ 2-microglobulina
cDNA	DNA complementar
CID	Coagulação intravascular disseminada
CoV	Coronavírus
CCoV	<i>Canine coronavirus</i> (Coronavírus canino)
CMI	<i>Cell mediated immunity</i> (Imunidade celular mediada)
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiaminotetracético)
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio imunoenzimático)
ETOH	Etanol a 100%
FA	Imunofluorescência
FCoV	<i>Feline coronavirus</i> (Coronavírus felino)
FECV	<i>Feline enteric coronavirus</i>
FeLV	<i>Feline leukemia virus</i> (Vírus da leucemia felina)
FIPV	<i>Feline infectious peritonitis virus</i>
FIV	<i>Feline immunodeficiency virus</i> (Vírus da imunodeficiência felina)
FMV-UTL	Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa
G-CSF	Factor estimulante de colónias de granulócitos
GM-CSF	Factor estimulante de colónias de granulócitos-macrófagos
HK	<i>Housekeeping</i>
HR	Humidade relativa
IFA	Imunofluorescência indirecta
IFN	Interferão

IHQ	Imunohistoquímica
IL	Interleucina
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LVI	Laboratório de Virologia e Imunologia
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
mRNA	RNA mensageiro
NK	<i>Natural killer</i>
nPCR	<i>Nested PCR</i>
nsp	<i>Non structural proteins</i>
ORF	<i>Open reading frame</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i> (Células monocíticas sanguíneas periféricas)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Tampão fosfato salino)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PIF	Peritonite infecciosa felina
qPCR	<i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i> ou <i>real time PCR</i> (PCR em tempo real)
REr	Retículo endoplasmático rugoso
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)
RT	<i>Reverse transcription</i> (Transcrição reversa)
RTC	<i>Replication/transcription complex</i>
RT-PCR	<i>Reverse-transcriptase polymerase chain reaction</i>
RT-qPCR	<i>Real time RT-PCR</i>
SAA	Soro amilóide A
SNC	Sistema nervoso central
SPF	<i>Specific pathogen free</i>
TGEV	<i>Transmissible gastroenteritis virus</i> (Vírus da gastroenterite transmissível)
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> (Factor de necrose tumoral)
Tregs	Linfócitos T reguladores
TRS	<i>Transcription regulation sequence</i>
UTR	<i>Untranslated regions</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> (Factor de crescimento endotelial vascular)
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo

## Lista de símbolos

---

%	Porcentagem
<	Inferior
°C	Graus Celsius
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gama
$\omega$	Omega
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{l}$	Microlitro
$\mu\text{M}$	Micromolar
dl	Decilitro
g	Grama
kb	Quilobase
kDa	QuiloDalton
kg	Quilograma
l	Litro
mg	Miligramma
min	Minuto
ml	Mililitro
pb	Pares de bases
pH	Potencial de hidrogénio iónico
pmol	Picomol
PO	<i>per os</i> (via oral)
qxh	<i>quaque x hour</i> (a cada x horas)
seg	Segundo
xg	Força centrífuga





## I. BREVE DESCRIÇÃO DAS ACTIVIDADES REALIZADAS NO ESTÁGIO CURRICULAR

O estágio curricular da aluna resultou da combinação de duas actividades. A primeira realizou-se em clínica de animais de companhia e a segunda, no desenvolvimento de um projecto em investigação laboratorial visando a elaboração da presente dissertação.

No total, o estágio decorreu ao longo de 8 meses, quatro em clínica e quatro em laboratório, cumprindo e superando o número de horas definidas para o estágio curricular.

O estágio em clínica de animais de companhia foi realizado na Clínica Veterinária da Pontinha, na qual a aluna cumpriu os horários de funcionamento do estabelecimento durante o período compreendido entre 3 de Setembro de 2012 e 21 de Dezembro de 2012. Durante este período a aluna observou e auxiliou nas diferentes práticas clínicas disponíveis nesta clínica de primeira opinião, nomeadamente, medicina interna, análises laboratoriais (bioquímicas, citologia), cirurgia, radiografia, internamento, ecografia abdominal, ecocardiografia, ortopedia e oftalmologia, resultando as últimas quatro de consultas de referência (Tabela nº 1).

Tabela nº 1 - Resumo das áreas abordadas durante o estágio em clínica, dividido pelas espécies canina, felina e NACs (novos animais de companhia). A organização que se pode observar na tabela resulta do estímulo iatrotrópico de cada caso.

	Canídeos	Felinos	NAC*	Total
Consulta geral/vacinação	150	67	7	224
Pré-cirurgia	6	1	0	7
Cirurgia	14	13	0	27
Oftalmologia	7	1	0	8
Endocrinologia	2	0	0	2
Dermatologia	5	0	0	5
Cardiologia	6	0	0	6
Gastrenterologia	7	1	0	8
Ecografia abdominal	7	0	0	8
Tratamentos	43	3	1	47
Urgências	6	1	0	7
Outros (Neurologia, Ortopedia, Fisioterapia)	3	5	0	8
Total	256	92	8	356

\*NAC – novos animais de companhia

A maioria dos animais que se apresentaram em consulta pertencia à espécie canina (n=256, 72%), seguindo-se a espécie felina (n=92, 26%) e, ainda, oito animais exóticos (NAC) (2%), como por exemplo, coelhos e tartarugas.

Foi possível assistir e participar em todos os componentes de uma consulta de medicina interna, tais como a realização da história clínica, a elaboração do exame físico para

estabelecimento de um plano de diagnóstico e, se necessário, a execução do tratamento mais adequado. Durante a consulta foi possível assistir e/ou executar vários procedimentos clínicos tais como recolha de material para análise (analíticas ou citológicas), desparasitações e vacinações, exame otoscópico, diversas limpezas e tratamentos de lesões, punção aspirativa por agulha fina (PAAF), algaliação para colheita de urina e/ou esvaziamento vesical, preparação e administração de medicamentos, entre outros.

Foi possível entrar em contacto e transmitir aos proprietários assuntos como a legislação referente ao controlo da Raiva, identificação electrónica e registo de animais no território Português, e ainda, a alteração de propriedade de um animal e preparação de documentos que permitam a viagem do animal para fora do território nacional.

Na área da cirurgia foi possível observar e auxiliar num total de 30 procedimentos cirúrgicos distintos (Tabela nº 2) e ainda monitorizar a anestesia cirúrgica e a recuperação pós-cirúrgica.

Tabela nº 2 – Resumo das cirurgias observadas durante o período do estágio curricular em clínica.

Tipo de cirurgia	Número realizado
Orquiectomia (cão/gato)	13
Ovariohisterectomia (OVH) (cadela/gata)	5
OVH por piómetra	2
Resolução de hérnia inguinal com estrangulamento intestinal	1
Extirpação de nódulos	2
Cirurgia ortopédica	3
Cirurgia oftálmica	1
Mastectomia	1
Extracção de dentes	1
Resolução de lesão labial	1

No internamento foi possível elaborar as fichas de medicações para o dia seguinte, a preparação e administração de medicações, a monitorização dos animais e quaisquer tratamentos necessários.

No decorrer do estágio surgiram algumas urgências, tais como cadelas com piómetras com ruptura uterina, intoxicação de gato e de cão e cesarianas em gatas e cadelas.

De Janeiro a Maio de 2013 foi realizado o estágio no Laboratório de Virologia e Imunologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa (LVI – FMV) no âmbito do projecto laboratorial para a tese de mestrado da aluna. Foram realizadas as práticas necessárias para cumprir o trabalho, aprendendo também o funcionamento diário de um laboratório (LVI – FMV e CIISA – FMV). Assim, foi possível entrar em contacto com a área de diagnóstico laboratorial, essencial em medicina veterinária, fazendo a ponte com a área clínica da primeira actividade de estágio.

## II. INTRODUÇÃO

### 1. Coronavírus felino

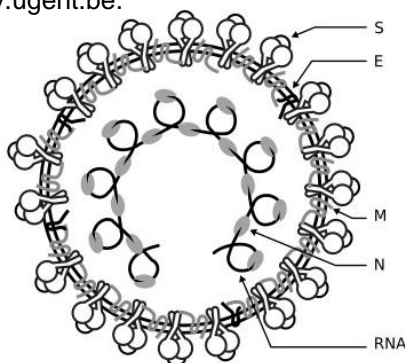
#### 1.1. Taxonomia

Os membros da família *Coronaviridae*, vírus RNA de sentido positivo com invólucro, juntamente com as famílias *Arteriviridae* e a *Roniviridae*, pertencem à ordem *Nidovirales*. A família *Coronaviridae* engloba ainda duas subfamílias, a *Coronavirinae* e *Torovirinae*, incluindo-se o género *Coronavirus* (CoV) na primeira (Murphy, Gibbs, Horzinek & Studdert, 1999). Os vírus pertencentes a esta família têm sido reconhecidos ao longo da história como importantes agentes de doença, afectando diversas espécies animais incluindo o Homem (Hagemeijer, Rottier, & de Haan, 2012). Actualmente, o género *Coronavirus* pode ser dividido em três novos géneros: *Alpha-*, *Beta-* e *Gammacoronavirus* (anteriormente denominados como grupos 1, 2 e 3, respectivamente). Dentro do género *Alphacoronavirus* podemos encontrar o Coronavírus Felino (FCoV) juntamente com o Vírus da Gastroenterite Transmissível (TGEV) Porcina e o Coronavírus Canino (CCoV), agrupados na espécie *alphacoronavirus 1* (Carstens, 2010).

#### 1.2. Organização do genoma

Os viriões do coronavírus felino são esféricos e revestidos (Figura nº 1). Dentro deste encontra-se o RNA genómico que consiste numa molécula linear de cadeia simples e sentido positivo de 29 kb (Chang, de Groot, Egberink & Rottier, 2010).

Figura nº 1 - Modelo da estrutura do coronavírus: diagrama esquemático da estrutura do virião. S, glicoproteína da espícula; M, glicoproteína de membrana; E, proteína do invólucro; N, proteína da nucleocápside. <http://www.fipv.ugent.be>.



O genoma contém toda a informação genética necessária para a síntese de RNA genómico e para a produção descontínua de mRNAs subgenómicos (Figura nº 2) (Hagemeijer et al., 2012).

Figura nº 2 - Representação do genoma de coronavírus felino. A sequência 5' é a sequência líder do FCoV (*Leader sequence*); a poliproteína polimerase (Pol1a e Pol1b) constitui dois terços do genoma; o gene S codifica a proteína da espícula (S); o gene E codifica a proteína do invólucro (E); o gene M codifica a proteína de membrana (M); o gene N codifica a proteína da nucleocápside (N); existem proteínas acessórias codificadas pelas ORFS 3a, b e c e 7a e b; o RNA termina numa extremidade 3' poliadenilada (polyA). Copiado de <http://www.fipv.ugent.be>.



As extremidades, 5' e 3', do genoma contêm regiões não traduzidas (UTRs, *Untranslated regions*), importantes na replicação e transcrição. Dois terços do genoma (5') consistem em duas grandes *open reading frames* (ORFs), ORF1a e ORF1b, que codificam a poliproteína polimerase (Pol1a e Pol1b). O restante terço (3') é composto por um conjunto de ORFs entre as quais se localizam os genes para as proteínas estruturais, intercaladas com ORFs que codificam proteínas acessórias, 3a, b e c e 7a e b (Rottier, 1999, Hagemeijer et al., 2012). O RNA está incluído na nucleocápside, formada pela proteína N (nucleocápside, N) (Figura nº1). Exteriormente à nucleocápside viral, os coronavírus possuem um invólucro formado pela proteína de membrana (M), a mais abundante, pela proteína (E) e pela proteína S (*spike*) que forma as espículas características da periferia do virião, constituindo uma “coroa” (*corona*) (Rottier, 1999). O genoma organiza-se na ordem 5'-Pol-S-E-M-N-3'. Na extremidade 5' encontra-se a sequência líder do vírus à qual se segue o gene da poliproteína polimerase. O último terço é constituído sequencialmente pelos genes S, E, M e por fim o gene N. Intercalada entre os genes S e E existe a ORF 3 (a, b e c) e após o gene N encontra-se a ORF 7 (a e b), ambas codificam proteínas acessórias ou não estruturais (*nsp*, *non structural proteins*). O RNA termina numa extremidade 3' poliadenilada.

### 1.2.1. Proteínas estruturais

#### 1.2.1.1. A proteína da espícula ou proteína S

O gene S codifica a glicoproteína S, (Bosch, van der Zee, Haan & Rottier, 2003) com massa molecular de cerca de 150 a 180 kDa (kiloDalton) e é sintetizada no retículo endoplasmático rugoso (REr). Esta proteína de grande dimensão constitui as espículas à superfície do virião e a sua estrutura divide-se em três domínios, com os subdomínios S1 (receptor, ligante) e S2 (fusão) com funções importantes. Não sendo necessária para a formação de novas partículas virais, é essencial para o ciclo de infecção viral dado que medeia a ligação eficiente do vírus ao seu receptor específico na superfície das células susceptíveis (Knife &

Howley, 2007; FIPV Research Group, 2008). Para além desta função, a proteína S determina o tropismo dos coronavírus e controla as funções de entrada e fusão celular (Rottier, Nakamura, Schellen, Volders & Haijema, 2005).

#### 1.2.1.2. A proteína de membrana ou proteína M

É o principal componente da estrutura do invólucro e possui uma massa molecular de 25 a 30 kDa. Apenas uma pequena porção da proteína se encontra exposta no exterior do invólucro viral. Possui importantes funções na montagem viral e interage com as proteínas N e S (FIPV Research Group, 2008).

#### 1.2.1.3. A proteína do invólucro ou proteína E

Esta proteína do invólucro é uma pequena proteína com cerca de 10 kDa. É essencial para apropriada formação de novas partículas virais com morfologia e infectividade normais (FIPV Research Group, 2008).

#### 1.2.1.4. A proteína da nucleocápside ou proteína N

É uma fosfoproteína de 43 a 50 kDa que interage com RNA genómico viral para formar a nucleocápside viral. Relaciona-se com a proteína M, levando à incorporação da nucleocápside nas partículas virais. É possível que tenha também importância na tradução e transcrição, já que se relaciona com a sequência líder do genoma (Knife & Howley, 2007; FIPV Research Group, 2008).

### 1.2.2. Proteínas não estruturais

#### 1.2.2.1. Poliproteína polimerase

O gene da proteína polimerase (Pol) tem cerca de 20 a 22 kb e compreende duas ORFs, 1a e 1b, traduzidas em duas poliproteínas, Pol1a e Pol1b. A ORF1a codifica uma proteína multifuncional (nsp 3), importante na síntese de RNA e uma proteína de ligação do RNA de cadeia simples (nsp 9). Na ORF1b encontra-se codificada a RNA polimerase dependente de RNA (Knife & Howley, 2007; FIPV Research Group, 2008).

#### 1.2.2.2. Proteínas acessórias

As ORFs 3 e 7 codificam 5 proteínas acessórias. O mRNA resultante da proteína 3 possui três ORFs (a, b e c) e o mRNA resultante da proteína 7 possui duas ORFs (a e b) (FIPV Research Group, 2008). A sua função não é exactamente conhecida, no entanto, em

particular as proteínas 7b e 3c, têm sido associadas à aquisição de virulência (Chang et al., 2010; Takano et al., 2011a).

### **1.3. Ciclo viral**

#### **1.3.1. Entrada na célula**

A entrada do vírus na célula é o primeiro passo no ciclo de infecção do coronavírus. É mediada pela ligação da proteína viral S a receptores de superfície da célula hospedeira (Regan, Ousterout & Whittaker, 2010).

Um receptor celular identificado para a proteína S dos vírus pertencentes à espécie *alphacoronavirus 1*, que inclui o coronavírus felino, é a proteína N-aminopeptidase (APN ou CD13), uma glicoproteína do tipo II de 150-160 kDa e uma metaloprotease (Le Poder, 2011). Vários estudos centrados no papel da APN felina (fAPN) têm revelado que este receptor só é funcional num dos serótipos do FCoV, o tipo II (Dye, Temperton & Siddell, 2007; Tekes et al., 2010).

O vírus entra na célula hospedeira por endocitose tendo que evadir-se à digestão pelos endossomas e lisossomas para libertação do genoma viral no citoplasma (Knife & Howley, 2007).

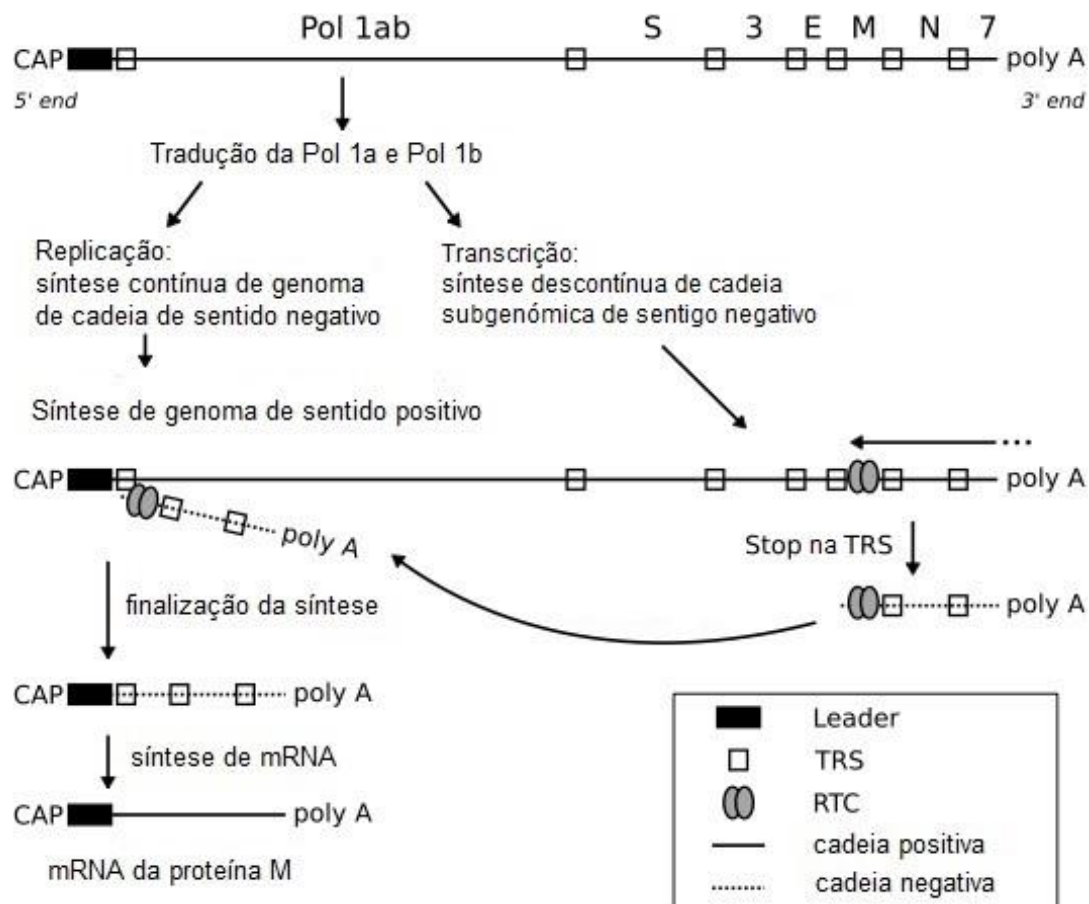
#### **1.3.2. Replicação e transcrição do genoma**

A transcrição do genoma do coronavírus (Figura nº 3) é baseada na síntese de RNA dependente de RNA. O resultado deste processo é a formação dum conjunto de mRNAs de diferentes tamanhos, dependendo da estirpe (Zu, Sola, Alonso, & Enjuanes, 2004).

Após a libertação do RNA genómico viral (de sentido positivo) no citoplasma, a RNA polimerase dependente de RNA viral é traduzida; esta proteína lidera a transcrição de RNA complementar em toda a sua extensão (de sentido negativo), a partir do qual um novo RNA genómico, um conjunto de mRNAs subgenómicos sobrepostos e um RNA líder são sintetizados.

Na célula infectada, os mRNAs são sintetizados em diferentes quantidades. A sequência líder, posicionada na extremidade 5' do genoma, pode ser encontrada em todos os mRNAs subgenómicos (FIPV Research Group, 2008). Em geral, cada mRNA subgenómico viral é utilizado para traduzir uma única proteína viral (Knife & Howley, 2007).

Figura nº 3 – Modelo da transcrição da proteína M do coronavírus. Neste processo, ocorre a síntese contínua da extremidade 5' que possui a sequência líder (*Leader*) e para cada mRNA que se forma, dá-se a transcrição descontínua de um gene do genoma, neste caso o gene M, levada a cabo pelo complexo de replicação-transcrição (RTC) que transcreve, a partir da extremidade 3', todo o comprimento do gene até chegar a uma sequência reguladora da transcrição (TRS). Após finalização da síntese de cadeia de sentido negativo para o gene em questão, dá-se a síntese de mRNA do gene M, agora de sentido positivo. Legenda: TRS – *transcription regulation sequence*; RTC – *replication-transcription complexes*. <http://www.fipv.ugent.be>.



### 1.3.3. Montagem viral

A montagem dos coronavírus é efectuada em membranas intracelulares. Estas pertencem ao compartimento intermédio, um complexo situado entre o retículo endoplasmático e o Complexo de Golgi.

A nucleocápside, formada pela interacção entre o RNA genómico e a proteína N, é sintetizada no citoplasma. As proteínas de membrana (S, M e E) que após a síntese no REr, se deslocaram para o compartimento intermédio, vão interagir com a nucleocápside. Subsequentemente, através de *budding* originam-se partículas virais que são transportadas para e através do Complexo de Golgi, por transporte vesicular, sofrendo várias



modificações. A partir do Complexo de Golgi são transportadas, novamente através de vesículas, para a membrana plasmática e libertadas por exocitose (Rottier, 1999).

#### **1.4. Transmissão entre espécies**

A maioria dos coronavírus infecta naturalmente apenas uma espécie animal ou um número limitado de espécies intimamente relacionadas (Knipe & Howley, 2007). Por outro lado, devido à alta frequência de erros gerados pela RNA polimerase, os coronavírus são reconhecidos pela sua capacidade de mutabilidade e de recombinação do RNA, constituindo um mecanismo importante na evolução natural destes vírus (Knipe & Howley, 2007). Destaca-se o exemplo do tipo II do FCoV que surge por recombinação do FCoV do tipo I com o CCoV.

Esta capacidade de mudança genética permite a adaptação deste Género a novos hospedeiros e nichos ecológicos, por vezes causando surtos zoonóticos com graves consequências (Le Poder, 2011). O exemplo mais evidente de preocupação na Saúde Pública é o coronavírus responsável pelo *severe acute respiratory syndrome* (SARS-CoV) (Graham & Baric, 2010), sendo capaz de infectar diferentes espécies animais, incluindo humanos, primatas não-humanos, guaxinim, cães, gatos e roedores (Knipe & Howley, 2007).

#### **1.5. Biótipos e serótipos do FCoV**

O termo genérico FCoV tem sido largamente aplicado a todos os serótipos e biótipos do coronavírus felino (Pedersen, 2009a). A maioria das infecções ou são assintomáticas ou resultam em alterações gastrointestinais autolimitantes ou de gravidade moderada. Nestes casos, o agente causal é denominado FECV (*Feline enteric coronavirus*), um biótipo de FCoV presente na maioria da população felina saudável. Por outro lado, o biótipo FIPV (*Feline infectious peritonitis virus*) utiliza-se para referir a forma virulenta de FCoV, agente causal da Peritonite Infecciosa Felina (PIF) (Vogel et al., 2010; Hora et al., 2013).

Ambos os biótipos de FCoV (FECV e FIPV) existem em dois serótipos baseados na neutralização do vírus *in vitro* por anticorpos anti-proteína S. Esta técnica foi utilizada primariamente, embora em 2003 Addie, Schaap, Nicolson e Jarrett tenham descrito uma metodologia molecular, através de *Reverse-transcritase polymerase chain reaction* (RT-PCR) que permite fazer a mesma distinção.

O tipo I é o mais prevalente, estando presente em 80 a 90% dos gatos infectados com FCoV. O tipo II é o menos comum (Pedersen, 2009a). Os dois tipos parecem utilizar formas distintas de entrada na célula e têm diferentes características de crescimento *in vitro* (Shiba, Maeda, Kato, Mochizuki & Iwata, 2007; Brown, 2011).

## **2. Epidemiologia**

### **2.1. Animais susceptíveis e prevalência**

A PIF é maioritariamente uma doença dos felinos doméstico, mas também já foi identificada no Leão Africano, Leão da Montanha, Leopardo, Chita, Jaguar, Lince, Serval, Caracal, Gato Selvagem Europeu, Gato da Areia e Gato Pallas (Pedersen, 2009a). Para haver desenvolvimento de PIF a premissa é a presença do FCoV, em qualquer dos seus biótipos. O FECV encontra-se mundialmente distribuído, sendo ubiqüitário e virtualmente presente em todas as populações de gatos.

A distribuição do FCoV nas diferentes populações varia. É altamente prevalente em gatis, onde até 80 a 90% dos animais são seropositivos, enquanto no ambiente doméstico 10 a 50% dos gatos estão infectados. Apesar destas altas prevalências, apenas 5 a 12% dos animais infectados desenvolvem PIF (Vogel et al., 2010; Brown, 2011). No campo, o serótipo I é predominante, causando 80 a 90% das infecções (Kummrow et al., 2005, Hornyák et al., 2012).

Também se observam algumas diferenças nas distribuições da prevalência do FCoV por regiões. No caso de animais aparentemente saudáveis positivos a FCoV, as prevalências mais elevadas foram observadas na Áustria e E.U.A., sendo superiores a 70 e 60%, respectivamente (citação de Benetka et al., 2004; Pedersen, Sato, Foley & Poland, 2004). Por outro lado, prevalências mais baixas foram reportadas no Reino Unido e Japão com 25,6% e 14,6%, respectivamente (Cave, Golder, Simpson & Addie, 2004). Também foram reportadas prevalências no caso de animais doentes, como em Portugal e na Malásia, onde foi detectado RNA de FCoV em 47,5% e 95% das amostras, respectivamente (Duarte, Veiga & Tavares, 2009; Amer et al., 2012).

É largamente reconhecido que o serótipo predominante é o tipo I. Por exemplo, no Reino Unido, Malásia, e Portugal este tipo tem prevalência de 97%, 97,5% e 79%, respectivamente (Addie et al., 2003; Amer et al., 2012; Duarte et al., 2009). Prevalências mais elevadas do tipo II, embora não superiores às do tipo I, foram observadas na Coreia (33,3%) (An et al., 2011). Na Áustria (Benetka et al., 2004) e Taiwan (Lin et al., 2009b), foram relatadas percentagens de co-infectados de 7% e 5,4%, respectivamente. No trabalho realizado por Mota em 2010, os resultados obtidos em Lisboa foram de 36,1% animais identificados como tipo I, 16,7% do tipo II e 47,2% co-infectados. Este último valor é muito superior aos resultados obtidos noutros países.

Alguns estudos têm sido dirigidos à determinação da prevalência em populações de gatos ferais e silvestres. Em 2012, Duarte, Fernandes, Santos e Tavares, num rastreio virológico

em território Português, determinaram que 33,3% dos gatos selvagens eram positivos (RNA) para FCoV. Já num estudo realizado por Bell, Toribio, White, Malik e Norris em 2006, na Austrália, em nenhum animal feral se detectou anticorpos anti-FCoV. As diferenças nos resultados podem dever-se às diferenças comportamentais e de estilo de vida em relação aos animais de criação e domésticos, para além de confirmarem a presença de animais portadores dentro das populações selvagens.

Bell et al. (2006) postularam que as diferentes densidades populacionais, tal como as condições ambientais, podem explicar as diferenças que estas prevalências exibem. Estas percentagens irão também de encontro à exposição a factores de risco a que os animais, em maior ou menor grau, estão sujeitos.

## **2.2. Factores de Risco**

Para além do papel do vírus em estabelecer a doença, existem factores extrínsecos (ambientais) e intrínsecos (do hospedeiro) que detêm um importante papel na instituição da doença. Os factores extrínsecos aumentam o nível de exposição ao vírus ou deprimem o sistema imunitário no momento da infecção pelo vírus. Os factores intrínsecos também aumentam a susceptibilidade dos gatos ao vírus (Golovko et al., 2013).

### **2.2.1. Idade dos animais**

A PIF tende a ocorrer em gatos com menos de dois anos (Rohrbach et al., 2001) ou, menos frequentemente, em gatos geriátricos (Foley, Poland, Carlson & Pedersen, 1997b; Benetka et al., 2004). A predisposição em gatos com idade inferior aos dois anos pode ser um reflexo da carga viral superior que estes animais exibem (Bell et al., 2006). Para além disso, nestes gatos o sistema imune é imaturo e os gatinhos estão expostos a episódios de *stress* como o desmame, vacinações e realojamento, que possivelmente comprometem ainda mais a imunidade (Worthing et al., 2012). A ocorrência em gatos geriátricos, com idade superior a 11 anos, pode estar associada ao declínio da imunidade celular, que ocorre com o avançar da idade (Bell et al., 2006).

### **2.2.2. Número de indivíduos por recinto**

Os gatos que provêm de ambientes com vários felinos têm o dobro da probabilidade de serem seropositivos ao FCoV quando comparados com os mesmos animais em ambiente de gato único (Cave et al., 2004). Em 2006, Holst, Englund, Palacios, Renström e Berndtsson determinaram que existe uma seroprevalência maior (71%) em gatos mantidos num grupo de pelo menos 5 indivíduos do que em gatos pertencentes a grupos menores

(29%). Estes resultados reflectem a facilidade da transmissão fecal-oral do FCoV em casas onde os animais partilham os mesmos areões.

No panorama dos gatis, 56% dos gatos que não excretam FECV no momento de entrada, tornam-se excretadores positivos passada uma semana (Pedersen et al., 2004). Conclui-se que a transmissão de FECV é altamente eficiente em gatis e em abrigos (Pedersen et al., 2004; Cave et al., 2004)

### 2.2.3. Predisposição de raças puras

Animais de raça pura têm um risco acrescido de virem a desenvolver PIF (Rohrbach et al., 2001). Em 2006, Pesteanu-Somogyi, Radzai e Pressler concluíram que animais de raça Birmanesa, Bengal ou Abissínia têm maior predisposição para o desenvolvimento de PIF, enquanto que a Persa e Siamesa não parecem ter risco aumentado quando comparadas com animais de raça cruzada. Golovko et al. (2013) propõem uma análise genética em gatos Birmaneses, com a finalidade de identificar genes associados à susceptibilidade para a doença que expliquem porque é que nem todas as raças são afectadas da mesma forma. Soma, Waba, Taharaguchi e Tajima (2013), encontraram relações significativas entre as raças Bosques da Noruega e Scottish Fold e a positividade viral. Os autores indicaram que este factor de risco varia grandemente entre países e regiões e que as perdas por PIF estão provavelmente mais ligadas a linhas familiares dentro de uma raça do que às raças em si. É de acrescentar que a raça como factor de risco tem a agravante de estes animais terem, frequentemente, origem em criadores. Nestes ambientes, os animais têm maior exposição ao agente pela introdução frequente de novos animais e, especialmente, devido à sobrepopulação a que estão sujeitos.

### 2.2.4. Imunossupressão e doenças concomitantes

Animais com infecções retrovirais imunossupressoras (FIV e FeLV) são particularmente susceptíveis ao desenvolvimento de PIF. Estes animais têm alta prevalência de infecções por FECV, possivelmente devido à reduzida capacidade de actuação do sistema imune (Foley et al., 1997b). Animais experimentalmente infectados com FIV possuíam títulos virais de FCoV nas fezes 10 a 100 vezes superiores comparando com os gatos do grupo de controlo (Vennema, 1999). Para além disso, estes animais excretaram o FCoV durante mais tempo e produziram níveis de anticorpos inferiores num período mais prolongado. Vennema (1999) sugeriu a participação de alguma forma de imunossupressão na ocorrência da mutação que irá dar origem à doença ou torná-la aparente.

A presença de doenças concomitantes associada ao aumento de risco do desenvolvimento de PIF não é totalmente clara e Foley et al. (1997b) e Cave et al. (2004) não associaram estes dois factores.

#### 2.2.5. Género dos animais

Os machos e animais inteiros têm um maior risco associado (Rohrbach et al., 2001; Benetka et al., 2004) em relação a fêmeas esterilizadas, talvez devido a diferenças comportamentais exibidas entre os dois géneros (Worthing et al., 2012). As diferenças imunitárias específicas entre sexos, em particular a imunidade celular e a influência hormonal (animais esterilizados) podem ser uma explicação (Benetka et al., 2004). Mais recentemente, a associação entre a doença e o género foi também identificada no estudo de Soma et al. (2013), referindo que a influência do *stress* da competição e luta entre machos estão também relacionadas com o aumento de doenças imunossupressoras, tais como FIV e FeLV.

#### 2.2.6. Sazonalidade

Foley et al. (1997b) e Rohrbach et al. (2001) encontraram uma associação entre a estação do ano e a ocorrência da doença, com mortalidade mais provável durante o Outono e Inverno. Apesar de a razão não ser totalmente conhecida, pensa-se que se deve ao facto dos animais passarem mais tempo recolhidos durante os meses de frio e à influência do *stress* associado às baixas temperaturas. A esta hipótese alia-se a capacidade de sobrevivência dos coronavírus em temperaturas baixas (4°C), durante alguns meses (Casanova, Rutala, Weber & Sobsey, 2009), e numa variedade de humidades relativas (de 20 a 60% HR) (Casanova, Jeon, Rutala, Weber & Sobsey, 2010). Outra hipótese prende-se com a maior parte dos animais nascerem nos meses de Verão e quando chegam às estações frias têm 6 a 12 meses, idade de maior susceptibilidade.

#### 2.2.7. Stress

A influência do *stress* na excreção viral foi avaliada por Pedersen, Allen e Lyons (2008) através da gravidez, parto e lactação para observação de *stress* natural e da administração de acetato de metilprednisolona na indução de *stress* artificial. Em nenhum dos casos houve influência na excreção viral pelos animais.

### 2.3. Transmissão

A infecção pelo FCoV ocorre, maioritariamente, pela via fecal-oral através do contacto indirecto com fezes contaminadas, sendo as caixas de areia partilhadas a principal fonte de infecção em grupos de gatos (Addie et al., 2009). Outra forma de infecção é o contacto com fómites (Addie & Jarrett, 2006), facilitada pela natureza ubiquitária do vírus. Estes aspectos tornam extremamente difícil a manutenção de uma população de gatos livre do vírus (Pedersen et al., 2008).

Considerando que o vírus raramente se encontra na saliva, a partilha de tigelas de comida e água e o *grooming* mútuo, comportamento social típico dos felinos, é de baixo risco na transmissão do vírus. A transmissão através de piolhos ou pulgas é considerada improvável (Addie et al., 2009).

A possibilidade da infectividade da urina foi reportada num estudo recente, de Hora et al. (2013) dada a detecção de mRNA do coronavírus felino na bexiga urinária de um gato.

A transmissão vertical do FCoV é altamente improvável (Addie & Jarrett, 2006; Dye, Helps & Sidel, 2008) e até há pouco tempo era descrito que a transmissão horizontal raramente se dava (Pedersen, Liu, Dott & Pesavento, 2009b). Apesar disso, Wang, Su, Hsieh e Chueh (2013) reportaram, recentemente, a sua ocorrência num abrigo de gatos em Taiwan, após um surto epizootico de PIF causado por um novo FCoV do tipo II.

### 2.4. Infecção

Experimentalmente, o FIPV é altamente infeccioso quando inoculado em gatos SPF (*specific pathogen free*) por meio de extractos de lesões ou através de fluidos de animais com PIF, (Pedersen et al., 2009b). Os resultados do estudo de Vogel et al. (2010) sugerem que doses baixas são suficientes para causar infecção (FECV), dado consistente com a disseminação eficaz do vírus na natureza.

Segundo Addie e Jarrett (2001), alguns animais, embora poucos, parecem ser resistentes à infecção, não tendo mostrado sinais de infecção como a excreção viral ou a presença de anticorpos séricos.

Os gatinhos naturalmente expostos ao vírus e que sofrem infecção começam a excretá-lo a partir das 10 semanas de idade e apresentam níveis de replicação viral muito inferiores, comparativamente a gatinhos mais velhos e gatos adultos que foram experimentalmente infectados (Pedersen et al., 2008). Ao contrário de gatos com infecções mais duradouras, os gatinhos responderam à reinfeção tal como gatos que recuperaram da infecção. Isto sugere que a imunidade materna teve algum papel na alteração do rumo da infecção

natural, embora não tenha havido estabelecimento de imunidade adquirida (Pedersen et al., 2008).

O vírus é mantido na população de gatos através de portadores crónicos e através de reinfecções em gatos que deixaram de excretar (Addie & Jarret, 2006). Em abrigos e gatis, quanto maior o tempo de permanência, maior o risco de infecção (Cave et al., 2004).

## **2.5. Excreção viral**

Até uma semana após a infecção, os animais excretam o FCoV nas fezes (Pedersen et al., 2008). A excreção pode ocorrer mais cedo, cerca de 2 a 3 dias pós-infecção (Kipar, Meli, Baptiste, Bowker & Lutz, 2010).

A excreção viral deste agente tem origem na porção posterior do tracto gastrointestinal (Herrewegh et al., 1997), no qual o cólon é o seu principal local de persistência (Kipar et al., 2010). A excreção viral através da saliva, para além de rara, não é uma boa forma de monitorização do vírus (Addie & Jarrett, 2001). Hora et al. (2013) sugeriram a urina como meio de eliminação viral após identificarem uma amostra de bexiga urinária como positiva ao FCoV.

Segundo Pedersen et al. (2008), a excreção do vírus é significativamente mais elevada em gatinhos do que em gatos adultos, um dado importante considerando que a prevalência de PIF é superior em gatinhos. Estes autores verificaram um pico de excreção fecal em gatinhos (2 a 4 meses) e em gatos mais velhos (8 a 13 anos), embora nestes com menor amplitude.

É nesta primeira fase que se dá a maior excreção viral e resolve-se em uma de três formas: recuperação, excreção persistente (crónica) ou excreção intermitente (Foley, Poland, Carlson & Pedersen, 1997a; Addie & Jarret, 2001; Pedersen et al., 2008) com duração variável.

O tipo de excreção pode ser afectado pela dose viral de inoculação. Doses inferiores levam a uma *clearance* mais rápida da infecção do que doses superiores (Vogel et al., 2010).

Addie e Jarret (2001) consideraram que a identificação de portadores de longa duração requer a obtenção de resultados positivos em, pelo menos, oito meses consecutivos através de RT-PCR de amostras fecais. Assim, obtém-se uma vigilância alargada no tempo porque os diferentes padrões de excreção podem levar a resultados falsos negativos, dada a grande dificuldade de distinção entre reinfecção e excreção intermitente.

Existe correlação entre a excreção fecal do vírus e o título de anticorpos do animal (Addie & Jarret, 2001; Pedersen et al., 2008). No estudo de Pedersen et al. (2008), os títulos de anticorpos séricos foram determinados por imunofluorescência indirecta (IFA) e os gatos

excretadores tendiam a ter títulos de 1:100 ou superiores. Pelo contrário, gatos que cessaram a excreção possuíam títulos de 1:25 ou inferiores.

### **3. Patogénese**

#### **3.1. Tropismo do coronavírus felino**

Ao transmitir-se pela via fecal-oral, o coronavírus felino penetra no epitélio intestinal a partir do lúmen e a sua replicação conduz à morte dos enterócitos, o que se pode manifestar através de diarreia de gravidade variável (Pedersen et al., 2008; Kennedy, 2009).

O FECV tem maior tropismo para os enterócitos maduros onde ocorre a sua replicação. No entanto, este biótipo pode estar presente em órgãos ricos em monócitos e macrófagos durante a infecção primária (Meli et al., 2004; Can-Sahna, Ataseven, Pinar & Oğuzoğlu, 2007), exibindo uma fase intestinal e tem também uma fase sistémica. Em 2005, Dewerchin, Cornelissen e Nauwynck acrescentaram que nem todos os monócitos são susceptíveis à infecção e os que são tanto podem ser infectados com FECV como com FIPV.

Embora a causa precisa da patogénese desta doença não seja conhecida, sabe-se que a aquisição de tropismo para os monócitos e macrófagos pelo vírus é um factor crítico para o seu desenvolvimento (Rottier et al., 2005; Kennedy, 2009). A partir deste pressuposto têm surgido ao longo dos anos várias hipóteses, existindo um vasto leque de estudos e publicações que tentam desvendá-la.

#### **3.2. Teoria da mutação interna**

A teoria da mutação interna ("*in vivo mutation transition hypothesis*", também conhecida por "*internal mutation hypothesis*") postula que uma mutação viral do FCoV (FECV) ocorre *in vivo*, dando origem a vírus (FIPV) que têm a capacidade de se disseminar sistemicamente através de monócitos e macrófagos, levando à ocorrência de PIF (Vennema, Poland, Foley & Pedersen, 1998; Rottier et al., 2005). Esta hipótese tem sido largamente aceite, porém, a natureza precisa das mutações não foram ainda identificadas. Apesar disso, tem sido demonstrada através de uma série de diferentes estudos a existência de correlação entre as manifestações da doença e alterações genéticas virais na proteína da espícula e nas proteínas não estruturais 3c, 7a e 7b (Brown, 2011).

##### **3.2.1. Alterações no gene S**

Rottier et al. (2005) e Chang, Egberink, Halpin, Spiro e Rottier (2012), sugerem que a mutação que leva à transição de FECV para FIPV é um processo com múltiplos passos



envolvendo, pelo menos, mutações tanto no gene S como em outras regiões do genoma. Terada et al. (2012) confirmaram que a região 5' deste mesmo gene não é necessária ao desenvolvimento de PIF. Já Chang et al. (2012) descobriram alterações no gene S que se correlacionam com o fenótipo da PIF em mais de 95% dos casos, num estudo efectuado com o serótipo I, o mais predominante, oferecendo uma base para a discriminação diagnóstica dos dois biótipos. Finalmente, numa abordagem alternativa que complementa estudos anteriores, Licitra et al. (2013), focaram-se na sequência da zona de clivagem da proteína S, entre as subunidades S1/S2, e concluíram que uma mutação nesta zona e a modulação de um local reconhecedor de furina, normalmente presente no gene S de FECV, são factores críticos que contribuem para o desenvolvimento da doença.

### 3.2.2. Alterações no gene 3c

Num estudo efectuado em 2010, o gene 3c, embora intacto em todos os FECVs, exibiu mutações na maioria dos FIPVs (71,4%) mas não numa proporção considerável de casos, implicando que mutações alternativas ou adicionais neste ou noutros genes tenham que ocorrer para gerar virulência (Chang et al., 2010). Numa extensão do trabalho anterior, Pedersen e a sua equipa (2012) verificaram a falta de infecciosidade dos coronavírus excretados nas fezes de gatos que, por sua vez, tinham sido infectados com FIPV com o gene 3c intacto. Este facto apoia uma consequência directa da teoria da mutação interna: o FCoV não é transmitido horizontalmente entre os gatos. Já Pedersen et al. (2009b), num estudo realizado em grupos de gatos de regiões distintas, afirmaram que as mutações em cada animal com PIF são únicas, indicando que ocorrem independentemente em cada hospedeiro e não por mutação num gato específico, infectando os outros horizontalmente. Por fim, Bálint et al. (2012) referem que a presença do conjunto 3a, b e c íntegro no coronavírus felino inibe a infecção produtiva dos macrófagos.

### 3.2.3. Alterações nos genes 7a e 7b

A região 7b parece oferecer uma vantagem selectiva aquando da infecção natural. Tem sido especulado o seu papel, dado que deleções nesta região levaram à atenuação da virulência (Vennema et al., 1998). Pelo contrário, Kennedy, Boedeker, Gibbs e Kania (2001) afirmaram que a ocorrência de alterações genéticas nas ORFs 7a e 7b parece estar relacionada com o aumento da incidência de PIF. Apesar disso, Lin et al. (2009a), identificaram pequenas deleções tanto no biótipo FIPV como no FECV, o que os levou a afirmar que as deleções neste gene não levam forçosamente a biótipos de baixa patogenicidade mas que podem

também estar associados aos biótipos de FCoV patogênicos. Mais recentemente, Takano et al. (2011a) também identificaram deleções no gene 7b em vírus com reduzida virulência. Ainda, para além do referido nos parágrafos anteriores, Pedersen et al. (2012), não encontraram alterações consistentes na sequência e produtos dos genes E, M, 3a e 3b nos biótipos de FCoV que os na doença em questão.

#### 3.2.4. Factores que facilitam a mutabilidade

Em 2012, Pedersen e seus colegas sustentaram que o FIPV encontra-se em maior pressão mutacional do que o FECV pois, independentemente do seu tipo, encontraram mais comumente mutações no primeiro biótipo do que no último.

Se o FECV se replica, mesmo que apenas brevemente, nos monócitos e macrófagos, então a mutação interna pode ocorrer nestas células e não necessariamente nas células intestinais (Pedersen et al., 2012).

A maior taxa de replicação viral ou a diminuída capacidade de *clearance* viral podem estar em relação com o desenvolvimento de PIF (Kipar, Baptiste, Barth & Reinacher, 2006a). A incapacidade de controlo da replicação do FCoV pode levar ao aumento da carga viral, aumentando assim as probabilidades de ocorrência de uma mutação patogénica (Herrewegh et al., 1997). A imunossupressão também pode facilitar a criação de mutantes por aumentar a taxa de replicação do FECV no intestino e inibindo a capacidade de defesa do hospedeiro. Assim, tanto os factores virais como os factores do hospedeiro determinam o desenlace da infecção.

### 3.3. Teoria da circulação de estirpes virulentas e avirulentas

Uma alternativa à teoria da mutação interna foi formulada por Brown, Troyer, Pecon-Slaterry, Roelke e O'Brien (2009), que sugerem a existência de duas estirpes distintas, uma virulenta e outra avirulenta, circulando nas populações felinas. Nesta, denominada "Teoria da circulação virulenta/avirulenta", os indivíduos expostos à estirpe virulenta e possuindo predisposição apropriada, desenvolvem a doença. No entanto, há pouco apoio epidemiológico para defender esta teoria, dada a baixa ocorrência da doença e os raros surtos de PIF nas populações domésticas de gatos.

Mais recentemente, Hora et al. (2013) consideram ambas as teorias plausíveis, sugerindo que o FIPV pode tanto surgir de forma endógena e, ainda, ser transmitido a diferentes gatos como pode ser um biótipo já virulento.

### 3.4. Teoria das *quasispecies*

O FCoV, à semelhança de outros coronavírus, pode formar *quasispecies* com heterogeneidade genética significativa, como resultado da acumulação de mutações durante a replicação viral. Battilani et al. (2003) revelaram que a heterogeneidade do genoma de FCoV relaciona-se com a gravidade e a forma clínica da PIF e com as lesões observadas nos órgãos dos animais afectados. Apesar disso, não é claro se se pode associar a patogénese à dinâmica das *quasispecies*.

### 3.5. Entrada do vírus nos macrófagos

A entrada do vírus na célula é o primeiro passo no ciclo de infecção dos coronavírus. É mediada pela ligação da proteína viral S através de receptores de superfície da célula hospedeira (Regan et al., 2010).

Até há relativamente pouco tempo, os problemas inerentes aos estudos *in vitro* prendiam-se no facto de a maioria deles serem efectuados com estirpes pertencentes ao serótipo II. Isto explica-se por o seu crescimento celular em cultura ter maior sucesso, contrariamente ao que sucede com o serótipo mais prevalente, o tipo I (Pedersen 2009a). Em 2010 um estudo levado a cabo por Tekes e colegas, utilizando quimeras de FCoV que expressam a proteína S do tipo II, cujo *background* genético é o FCoV do tipo I, vem refinar os resultados obtidos em estudos prévios. Os autores confirmaram o papel da APN, enquanto receptor primário para o FCoV. Em vários estudos se afirmou que a fAPN é um receptor para o tipo II (Dye et al., 2007, Tekes et al, 2008) e Tekes et al. (2010) acrescentam ainda que este receptor não é funcional para o tipo I. Para além disso, revelam que a proteína S do FCoV é também o elemento determinante para a cinética de replicação do FCoV em cultura celular. Este dado é de grande importância já que o fraco crescimento em cultura do tipo I do FCoV, como mencionado, tem sido um grande obstáculo no seu estudo.

O receptor que o tipo I utiliza ainda não foi identificado. Sabe-se que ambos os tipos, I e II, podem utilizar como co-receptor o fDC-SIGN, homólogo felino da DC-SIGN (*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non integrin* humana), uma lecitina do tipo C (Regan et al., 2010; Van Hamme, Desmarets, Dewerchin & Nauwynck, 2011). Estas lecitinas são expressas no epitélio intestinal, o local inicial da infecção do FCoV. Provavelmente há um outro receptor envolvido (Van Hamme et al., 2011).

Van Hamme, Dewerchin, Cornelissen, Verhasselt e Nauwynck (2008) concluíram que o FIPV entra nos monócitos através duma via independente de clatrina e cavéola mas dependente de dinamina e, ainda, que é ligeiramente sensível à depleção de colesterol. Dewerchin et al. (2008) acrescentam ao estudo anterior que o FIPV entra nos monócitos

através duma via independente de clatrina e de cavéola mas que não exige dinamina, sugerindo que o vírus é internalizado por uma via que ainda não terá sido descrita. Regan, Shraybman, Cohen e Whittaker (2008) consideram que a protease mais importante na mediação da entrada do FCoV do tipo II é a catepsina B, tendo a catepsina L possivelmente um papel mais secundário.

O vírus entra na célula hospedeira por endocitose sendo incorporado através dum endossoma (Van Hamme, Dewerchin, Cornelissen & Nauwynck, 2007), que é subsequentemente acidificado por bombas de prótons. Takano et al. (2008a) clarificaram que a acidificação do endossoma é necessária para a invasão pelo FIPV. É possível que a entrada dos coronavírus siga uma via dependente do pH aquando da formação dos endossomas, existindo a sugestão de que o pH baixo no endossoma seja necessário para a activação de catepsinas iniciando a fusão (Eifart et al., 2007; Regan et al., 2008).

A entrada na célula é um alvo atractivo para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

### **3.6. Replicação viral**

A replicação viral nos macrófagos parece ser bastante lenta durante as primeiras duas semanas. Em infecções experimentais, 10 a 21 dias após a infecção primária verifica-se um aumento drástico na percentagem de infiltração de macrófagos infectados nos tecidos, da replicação viral e da disseminação do FCoV (Pedersen, 2009a). Este aumento coincide com o aparecimento de anticorpos específicos, que no estudo de Meli et al. (2004) ocorreu entre 14 a 22 dias pós-infecção. Caso haja recuperação do estado hígido, provavelmente dá-se durante este período inicial (Pedersen, 2009a).

O FCoV replica-se numa taxa superior nos monócitos e nos macrófagos do que nos enterócitos (Pedersen et al., 2012) e ambos os biótipos podem causar virémia por replicação viral no sangue, embora no caso do FECV ocorra em níveis bastante inferiores. Assim, a virémia por FCoV não leva necessariamente ao desenvolvimento de PIF (Meli et al., 2004; Sharif et al., 2011).

A replicação viral é induzida pela produção das Interleucinas (IL)-1 $\beta$  e IL-6 e pelo factor de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Takano, Hohdatsu, Toda, Tanabe & Koyama, 2007b; Regan, Cohen & Whittaker, 2009; Takano, Azuma, Hashida, Satoh & Hohdatsu, 2009a) e sabe-se que mutações no epítipo neutralizante do gene S reduzem a replicação viral em monócitos e macrófagos (Takano et al., 2011a).

A replicação viral é também um alvo de estudo para o desenvolvimento de fármacos que permitam o controlo desta doença.

### 3.7. Formação de anticorpos

A interacção entre os anticorpos e as células infectadas é desconhecida (Dewerchin, Cornelissen & Nauwynck, 2006), tornando pouco claro o papel dos anticorpos na patogénese da PIF.

Os anticorpos são neutralizantes *in vitro* mas parecem ter um efeito facilitador da doença *in vivo* (Pedersen, 2009a).

A ligação dos anticorpos ao vírus pode bloquear os receptores de APN prevenindo a ligação do vírus à célula-alvo. No entanto, esta mesma ligação parece ter também um efeito adverso, realçando o *uptake* dos macrófagos em animais já infectados. Este fenómeno, denominado ADEI (*antibody- dependent enhancement of infectivity*) – potenciação da infectividade dependente de anticorpos – é específico para os anticorpos e macrófagos e parece envolver anticorpos para a espícula viral e a proteína de membrana (Dewerchin et al., 2006), contribuindo para o agravamento da doença (Takano et al., 2007b; Takano, Kawakami, Yamada, Satoh & Hohdatsu, 2008b; Takano et al., 2009a).

Os anticorpos podem também falhar na neutralização ou na prevenção da disseminação viral porque pode existir replicação viral na célula infectada sem que haja posterior montagem dos antígenos virais na membrana plasmática, tornando-os invisíveis para os intervenientes da imunidade humoral (Cornelissen, Dewerchin, Van Hamme & Nauwynck, 2007). A referida incapacidade de acção da imunidade humoral pode dever-se a um mecanismo de internalização de proteínas virais de ligação, induzida por anticorpos específicos (Dewerchin et al., 2006). Este mecanismo pode levar a um estado quiescente, podendo a célula continuar a produção da prole viral sem ser eliminada.

### 3.8. Tecidos alvo

Após infecção dos macrófagos, o vírus FCoV dissemina-se através destas células para locais específicos no organismo. Esta disseminação depende do sistema imunitário do hospedeiro, em particular da resposta imunitária celular (Takano et al., 2007b). Muitos dos tecidos e órgãos alvo são ricos em células fagocíticas, tais como os linfonodos mesentéricos, a serosa intestinal e, embora em menor dimensão, a pleura e o omento. Alguns podem ainda invadir as meninges, em especial na superfície caudal e ventral do cérebro, em redor dos ventrículos, a dura-máter da medula espinhal, a úvea e retina (Foley, Lapointe, Koblik, Poland & Pedersen, 1998; Pedersen, 2009a).

### **3.9. Formação da lesão**

Ao atingirem os tecidos alvo, os monócitos e macrófagos infectados aderem às células endoteliais (Kipar et al., 2005) levando à destruição da membrana basal (Kipar et al., 2005). Na PIF, uma característica morfológica menos comum é a formação de flebites e periflebites granulomatosas que podem tornar-se necróticas e que são consequência da chegada dos monócitos infectados e activados pelo FCoV (Kipar et al., 2005). Na formação desta lesão, a hipersensibilidade do tipo III parece ter um papel de relevo.

As citocinas e outros mediadores inflamatórios libertados pelos macrófagos e células polimorfonucleares assumem um importante papel nas características e intensidade das lesões (Pedersen, 2009a). Por exemplo, Takano et al. (2009b) sugerem que o TNF- $\alpha$ , o G-CSF (Factor estimulante de colónias de granulócitos) e o GM-CSF (Factor estimulante de colónias de granulócitos-macrófagos), produzidos pelos monócitos e/ou macrófagos infectados pelo FIPV, estejam envolvidos na formação das lesões.

As lesões originadas, chamadas piogranulomas, são caracterizadas por macrófagos rodeados por um exsudado rico em proteínas e uma minoria de linfócitos, neutrófilos e células plasmáticas (Kipar et al., 2005; Pedersen, 2009a) e correspondem à lesão mais típica da doença, encontrada na forma exsudativa da mesma.

#### **3.9.1. Características anatomopatológicas das lesões mais comuns**

Tipicamente, a PIF manifesta-se de duas formas distintas que reflectem os extremos clínicos de um processo que é contínuo, existindo muitos gatos com sinais e lesões intermédias (Addie et al., 2009). Assim, a doença pode manifestar-se pela inflamação generalizada das serosas com a presença de exsudado pleural e/ou ascítico (Takano et al., 2011a), sendo esta denominada de forma exsudativa (húmida, não parenquimatosa). A outra forma, denominada não exsudativa (seca, parenquimatosa) é caracterizada por lesões granulomatosas muito difundidas, surgindo em vários órgãos como por exemplo nos pulmões, fígado, tecido linfóide e cérebro (Brown et al., 2009; Pedersen, 2009a; Addie et al., 2009).

Ao contrário do piogranuloma, descrito anteriormente, o granuloma contém pequenos focos de macrófagos no centro, muitos dos quais não contêm antígenos virais e, caso contenham, existem em pequena quantidade, e são rodeados por densos infiltrados de linfócitos, em especial células B e células plasmáticas. As descritas lesões granulomatosas da PIF seca são menos comuns e menos dispersas que os piogranulomas da PIF húmida e tendem a estender-se desde a superfície dos órgãos até ao parênquima subjacente, daí a sua denominação alternativa de parenquimatosa. Tem-se verificado que a PIF seca é

frequentemente precedida por um breve episódio de PIF húmida. Por tal, as lesões de PIF seca são um remanescente de uma infecção inicial orientada para as serosas (Pedersen, 2009a). A PIF seca também pode tornar-se húmida nos estadios terminais da doença quando o sistema imunitário colapsa.

As lesões na forma húmida concentram-se no omento e na serosa das vísceras abdominais. O omento está geralmente espessado dado o edema, o infiltrado inflamatório e a necrose e retraído numa massa compacta. As lesões no tórax concentram-se na pleura e pericárdio mas são menos comuns. Similarmente, as lesões na forma seca ocorrem geralmente no abdómen (rins, linfonodos mesentéricos, fígado e ceco/cólon) e são raras na cavidade torácica (Pedersen, 2009a).

Histologicamente, e como referido anteriormente, as lesões da forma húmida da PIF (sobretudo vasculite) sugerem uma reacção de hipersensibilidade do tipo III (Berg, Ekman, Belák & Berg, 2005; Kipar et al., 2005). Por outro lado, o cenário histopatológico na forma seca da PIF (principalmente formações granulomatosas) aponta na direcção de uma reacção imune do tipo IV (Berg et al., 2005).

### 3.9.2. Características anatomopatológicas das lesões oculares e de SNC

Lesões nos olhos e no sistema nervoso central (SNC) são mais frequentemente observadas em casos de PIF seca do que na sua forma húmida, podendo ocorrer na presença ou ausência de lesões torácicas e/ou abdominais.

As lesões no SNC concentram-se nas meninges e epêndima e também se estendem ao cérebro, medula espinhal ou nervos espinhais subjacentes. As lesões são particularmente comuns na zona caudo-ventral do cérebro (Foley et al., 1998; Foley, Rand & Leutenegger, 2003; Pedersen, 2009a).

Em relação às lesões oculares, a característica morfológica mais comum é um infiltrado linfocítico e plasmocítico na úvea anterior, apresentando-se difuso ou nodular. Manifesta-se por discoloração da íris, por vezes com focos granulomatosos. A presença de precipitados queráticos *mutton-fat* é comum na zona posterior da córnea. Estes são compostos por macrófagos, outras células inflamatórias e fibrina que exsudaram do tracto úveal inflamado (Foley et al., 1998; Diaz & Poma, 2009; Pedersen, 2009a).

## 4. Sinais clínicos

A apresentação clínica da PIF é muito variável e reflecte a variabilidade da distribuição das lesões (Addie et al., 2009).

### 4.1. Forma húmida da PIF

A forma mais comum da doença é a húmida, embora nas últimas décadas se observe um aumento no número de casos da forma seca (Pedersen, 2009a). Raramente ocorrem em simultâneo mas caso aconteça, corresponde à transição de uma para a outra (Pedersen, 2009a). Dada esta sobreposição, o cuidado no diagnóstico deve ser reforçado (Addie et al., 2009).

O período de incubação em infecções naturais é desconhecido, havendo evidências que esta possa ficar latente, correspondendo a um estado subclínico durante semanas, meses ou mesmo anos até que a doença se comece a manifestar (Pedersen, 2009a). Retrospectivamente, o começo da sintomatologia da PIF pode ser precedida por uma longa história de alterações inespecíficas do estado hígido do animal e por debilidade no crescimento, no caso de gatinhos (Pedersen, 2009a).

Os sinais iniciais são pouco característicos e incluem uma indisposição progressiva, febre flutuante e refractária a antibióticos, inapetência e perda de peso. Ocasionalmente, os animais mantêm a boa disposição e a condição corporal (Addie et al., 2009).

A distensão abdominal devida a ascite é a manifestação mais notável da PIF húmida. Na necrópsia, o volume de líquido de derrame encontrado nesta cavidade pode atingir um litro, sendo pouco ou moderadamente turvo, mucoso e tingido de amarelo (Pedersen, 2009a).

A presença de derrame torácico e pericárdico podem ocorrer isoladamente ou em conjunto com o derrame abdominal. No caso de o derrame se limitar à cavidade torácica, os animais geralmente apresentam sinais de *stress* respiratório, tais como apneia, dispneia ou taquipneia.

O envolvimento ocular e do SNC na forma húmida da PIF constitui apenas 9% dos sintomas observados (Pedersen, 2009a).

Outras lesões têm sido reportadas dada a raridade da sua ocorrência. São exemplos, o aumento do tamanho escrotal, por extensão da peritonite à *tunica vaginalis* dos testículos, lipidose hepática, síndrome da fragilidade cutânea (Trotman, Mauldin, Hoffmann, Del Pietro & Hess, 2007) e sinovite generalizada por deposição de complexos imunes, manifestando-se através de febre e claudicação (Pedersen, 2009a).



#### 4.2. Forma seca da PIF

Os sinais clínicos da PIF seca, nas primeiras fases da doença, podem ser apenas febre, letargia e anorexia. Como o nome indica, esta forma implica a ausência ou acentuada escassez de líquido de derrame de tal forma que só possa ser identificado *pos-mortem*. Outros sinais dependerão dos órgãos e tecidos afectados pelas lesões características.

As lesões abdominais da PIF seca são maiores, em menor número e menos disseminadas do que as lesões da outra forma da doença. Estas estendem-se desde a serosa ao parênquima dos órgãos e encontram-se frequentemente nos rins, nódulos linfáticos mesentéricos e menos frequentemente, no fígado e nódulos linfáticos hepáticos. O envolvimento renal pode levar a renomegália (Lewis & O'Brien, 2010), passível de ser detectada à palpação; o aumento massivo de um linfonodo abdominal pode levar ao errático diagnóstico de neoplasia abdominal (Kipar, Koehler, Bellmann & Reinacher, 1999). As lesões abdominais são frequentemente detectáveis à palpação abdominal e, por vezes, associadas a dor local. Lesões na parede do cólon e na junção íleo-ceco-cólica surgem ocasionalmente e podem ser associadas a diarreia crónica e vômito. Pode ainda haver envolvimento torácico com distribuição das lesões pela pleura e pulmões. Foi descrito um caso de envolvimento do pericárdio (deMadron, 1986 referido em Pedersen, 2009a).

Ao contrário da forma húmida da PIF, na forma seca os sinais clínicos associados a lesões oculares e do SNC predominam, constituindo cerca de 60% dos casos (Pedersen, 2009a).

Os sinais clínicos neurológicos em gatos com PIF reflectem a localização neuroanatômica das lesões que podem estar dispersas em qualquer zona do SNC (Diaz & Poma, 2009).

Convulsões, estados mentais alterados, comportamento anormal, sinais cerebelares e vestibulares nomeadamente, nistagmus, *head tilt* e *circling*, ataxia, tetraparésia, hidrocefalia, hiperestesia e reacções posturais anormais são vários exemplos de sintomatologia neurológica descrita (Foley et al., 1998; Boettcher et al., 2007; Timmann et al., 2008; Diaz & Poma, 2009).

No envolvimento ocular, as manifestações predominantes são a uveíte e corioretinite. A alteração da coloração da íris é muitas vezes um sinal prematuro da doença. Discoria, anisocoria secundária a iridite, perda súbita de visão (Ives, Vanhaesebrouck & Cian, 2013) e hífema. Na córnea destacam-se os precipitados queráticos, anteriormente referidos. Outras lesões focais similares a granulomas dos órgãos parenquimatosos podem ser aparentes na íris, distorcendo a forma da pupila (Pedersen, 2009a).

Outras lesões reportadas da forma seca, embora raras, incluem priapismo num gato castrado (Rota, Paltrinieri, Jussich, Ubertaini & Appino, 2008), orquite piogranulomatosa com aumento bilateral do escroto (Lewis & O'Brien, 2010), sinais cutâneos, sob a forma de

múltiplas lesões nodulares causadas por vasculite (Cannon, Silkstone & Kipar, 2005) e pápulas intradérmicas no pescoço e parede torácica no estadio final da doença (Declercq, De Bosschere, Schwarzkopf & Declercq, 2008).

#### **4.3. Forma intestinal da PIF**

Addie e Jarrett (2006) descrevem ainda uma terceira forma da doença, embora quase na totalidade da literatura só se encontrem discriminadas as duas mais convencionais, descritas anteriormente. Os autores consideram que esta forma ocorre quando o intestino é o único órgão a ser afectado pelos granulomas típicos da PIF. As suas lesões encontram-se maioritariamente no cólon e os sinais clínicos apresentados pelos animais são, geralmente, diarreia crónica e/ou vómitos. A palpação do abdómen pode revelar espessamento do intestino.

### **5. Imunidade na PIF**

O mecanismo pelo qual os gatos desenvolvem PIF não é conhecido (Addie & Jarrett, 2006). A imunidade humoral parece não ser importante na protecção da infecção pelo FIPV, participando, pelo contrário, no estabelecimento da doença (Pedersen, 2009a). O seu aparecimento e as diferentes formas clínicas vão depender da eficiência da imunidade celular. O estabelecimento de uma resposta humoral forte e de uma resposta celular muito fraca ou inexistente levará ao estabelecimento da forma exsudativa; uma resposta imunitária humoral simultânea a uma resposta imunitária celular intermédia, resultará na forma não exsudativa e a presença da resposta humoral e de uma resposta forte pela imunidade celular, pode prevenir a doença (Paltrinieri, Cammarata, Cammarata & Comazzi, 1998a; Pedersen, 2009a). Estas são hipóteses que tentam explicar o complicado envolvimento imunológico em reacção a esta infecção.

#### **5.1. Imunidade passiva**

A imunidade maternal parece ter um lugar na alteração do curso de uma infecção natural em gatinhos, embora não culminando no estabelecimento de imunidade adquirida (Pedersen et al., 2008).

#### **5.2. Imunidade activa**

A imunidade gerada na primeira fase da infecção desenvolve-se lentamente, tem intensidade variável e duração curta. O contacto com o FCoV não activa os mecanismos

imunitários para oferecer protecção ao hospedeiro numa possível reinfecção (Bell et al., 2006), parecendo imitar a infecção primária (Pedersen et al., 2008).

#### 5.2.1. Imunidade Humoral

De Groot-Mijnes, van Dun, van der Most e de Groot (2005) sugerem o aparecimento tardio dos anticorpos como possível explicação para a sua ausência como parte da defesa do hospedeiro. De facto, estes anticorpos específicos para os antígenos do FIPV participam em dois processos imunes distintos, embora nenhum deles tenha um papel protector, existindo ainda outros eventos que envolvem os referidos anticorpos na patogénese da PIF (Pedersen, 2009a).

O primeiro processo constitui uma reacção de hipersensibilidade do tipo III centrado nas pequenas vénulas e caracterizado por vasculite, edema, migração de células inflamatórias e necrose (Pedersen, 2009a), identificando-se nas lesões através da presença de antígenos e anticorpos que, reagindo com o complemento, formam complexos imunes (Murphy et al., 1999). Na PIF, a indução da formação destes complexos e o seu depósito (Takano et al., 2007a) contribuem para o aparecimento dos sinais clínicos associados à doença (Pedersen et al., 2012). Porém, a confirmação da responsabilidade dos complexos imunes na vasculite associada à PIF em específico não é certa, já que estes se podem depositar inespecificamente, especialmente em locais de necrose nas paredes dos vasos (Kipar et al., 2005).

Aparentemente, a formação do líquido de derrame é induzida pela hipersensibilidade do tipo III através do aumento da permeabilidade vascular mas Takano, Ohyama, Kokumoto, Satoh e Hohdatsu (2011b), sugerem que outros factores devem causá-la. Estes autores apontam para a influência de factores de permeabilidade vascular, tais como o factor de crescimento endotelial vascular (VEGF - *vascular endothelial growth factor*), produzidos por monócitos/macrófagos infectados por FIPV, associando a sua produção com a proliferação do vírus. Afirmam ainda que os níveis plasmáticos de VEGF podem reflectir o estatuto imunológico dos gatos infectados por FIPV. O dano vascular e a activação do complemento resultam em coagulopatia intravascular disseminada (CID), esta coagulopatia pode contribuir para a natureza mucosa do exsudado da PIF (Pedersen, 2009a).

O segundo processo imune refere-se à ineficácia dos anticorpos na eliminação do vírus que, inversamente, aceleram o desenvolvimento da PIF *in vitro* (Vennema et al., 1990) e *in vivo*, em gatos previamente imunizados contra o vírus (Takano et al., 2008b), embora não se tenha verificado em infecções naturais. Este fenómeno, já referido anteriormente como ADEI, ocorre pela presença de anticorpos anti-proteína S do FCoV, sendo induzido pela

reinfectão com o mesmo serótipo (Takano et al., 2008b) e pode explicar o desenvolvimento acelerado dos sinais clínicos, o curso encurtado da doença e a morte prematura na PIF (Myrrha et al., 2011). Apesar disso, o papel do ADEI não é claro nas infecções naturais (Addie et al., 2009), podendo as diferenças no estatuto imunológico de gatos infectados com FCoV serem a explicação pela qual não se observa este fenómeno nos gatos domésticos (Takano et al., 2008b).

Os macrófagos infectados pelo vírus produzem factores de sobrevivência e de diferenciação (CD40L – ligando CD40, IL-6, BAFF - *B-cell-activating factor*) dos linfócitos B em excesso e actuam de modo autócrino com promoção da diferenciação em células plasmáticas (Takano et al., 2009a), participando também no estabelecimento pouco eficaz da resposta imunitária humoral.

#### 5.2.2. Imunidade Celular

Considera-se que o desenvolvimento patológico, após disseminação viral sistémica, dependa em larga escala do estado imunitário do hospedeiro, particularmente da presença ou ausência da indução da imunidade celular ( $T_H1$ ) (de Groot-Mijnes et al., 2005).

Um achado analítico comum em gatos com PIF é a presença de linfopénia causada por apoptose (Paltrinieri, Ponti, Comazzi, Giordano & Poli, 2003), com depleção dos linfócitos T incluindo as células CD4+ e CD8+ (de Groot-Mijnes et al., 2005). de Groot-Mijnes, et al. (2005) sugerem que o resultado da infecção é determinado pela eficácia precoce da resposta dos linfócitos T e que a depleção destas células e a sua resposta antiviral são forças opostas. A apoptose ocorre principalmente nos linfonodos e baço mas também no sangue periférico (Dean, Olivry, Stanton & Pedersen, 2003; Kipar et al., 2006b).

O FIPV não se replica nos linfócitos, pelo que a explicação para a sua apoptose não é a indução directa da infecção mas outros factores indirectos (Haagmans, Egberink & Horzinek, 1996; Takano et al., 2007a), sendo a causa mais provável para esta linfopénia a acção do TNF- $\alpha$  (Dean et al., 2003; Takano et al., 2007a). As células CD8+ são mais susceptíveis à indução da apoptose pelo TNF- $\alpha$  do que outras populações de linfócitos, particularmente dos linfócitos B (células CD21+) (Takano et al., 2007a).

Num estudo mais recente, Vermeulen et al. (2013) determinaram pela primeira vez que a depleção linfocítica também engloba as subpopulações de linfócitos T Natural Killer (NK) e linfócitos T reguladores (Tregs), verificando a sua drástica diminuição no sangue periférico, linfonodos mesentéricos e baço em gatos com PIF. Adicionalmente, verificaram que outros linfócitos reguladores também estavam diminuídos no sangue e linfonodos (CD4+CD25-Foxp3+ e CD3+CD8+Foxp3+). Estas descobertas traduzem-se numa reduzida capacidade

da imunidade inata (NK) para reagir contra a infecção viral e para subsequentemente auxiliar as respostas imunitárias. Também demonstram uma reduzida capacidade da imunidade adquirida (células Tregs) para suprimir o efeito da inflamação que irá provocar lesões de tecidos.

A apoptose dos linfócitos T relaciona-se com a replicação viral (Haagmans et al., 1996), pois o aumento do RNA viral no sangue é consistentemente observado em animais em fase terminal, indicando que a progressão fatal da doença é uma consequência directa da perda de controlo imune (de Groot-Mijnes et al., 2005). Mas, na verdade, não se sabe se é o nível de virémia que determina o resultado da infecção ou se é a infecção que determina o nível de virémia, apesar de se observarem em simultâneo (Pedersen, 2009a).

Um dos argumentos que aponta para a imunidade celular como a imunidade que é activada nesta infecção deve-se à detecção da reacção de hipersensibilidade do tipo IV (retardada) nas lesões focais da PIF seca (Pedersen, 2009a). Patrineri, Parodi, Cammarata e Mambretti (1998b) detectaram-na pela progressiva activação de linfócitos T, maioritariamente CD4+, e pela presença de granulócitos e macrófagos. Esta reacção não é tipicamente observada na PIF e geralmente ocorre em condições de estimulação crónica de macrófagos, como por exemplo, na Tuberculose (Berg et al., 2005).

#### 5.2.2.1. Padrões de expressão de citocinas na PIF

Vários estudos sobre a PIF tentaram fazer uma ponte entre a ocorrência da doença e certos perfis imunológicos T<sub>H</sub>1 de expressão de citocinas (Pedersen, 2009a). A avaliação das citocinas é uma importante componente do estudo da inflamação e infecção. Por exemplo, a identificação do aumento da transcrição de uma citocina em particular é uma abordagem comum para revelar o envolvimento dessa citocina num processo imune (Dean, Higgins, LaVoy, Fan & Pedersen, 1998). No caso particular da infecção por FCoV e da Peritonite Infecciosa Felina, apesar de pouco consistentes, estes estudos mostram que os perfis de citocinas estão alterados em gatos com PIF quando comparados com gatos saudáveis (Dean et al., 2003; Kiss, Poland & Pedersen, 2004). Assim, tem sido sugerido que a produção excessiva destes mediadores inflamatórios tem um papel importante no processo da doença, embora seja desconhecido (Regan et al., 2009).

Em 2001, Kipar et al., analisaram quantitativamente a expressão de citocinas em culturas de monócitos felinos, obtendo resultados variáveis. Enquanto que o mRNA da IL-1 $\beta$  e do TNF- $\alpha$  se verificou expresso em todas as amostras, já o mRNA das IL-6, IL-10 e IL-12p40 encontrou-se geralmente expresso a um nível mais baixo que as primeiras citocinas e nem sempre foi detectado.

Gatos infectados com FCoV e sem sintomatologia de PIF exibem, nos linfonodos mesentéricos, níveis baixos de expressão do mRNA da IL-6, quando comparados com gatos com PIF (Kipar et al., 2006b). Nestes, esta interleucina encontra-se aumentada no líquido ascítico (Goitsuka et al., 1990). Takano et al. (2009a) mostraram que gatos com PIF exibem maior expressão da IL-6 nas células monocíticas sanguíneas periféricas (PBMCs), quando comparados com gatos SPF. Este último estudo sugere que a IL-6 está envolvida na formação de vasculite mediada por complexos imunes e, portanto, na patogénese da PIF. Este envolvimento pode ser devido à sua capacidade de activação de linfócitos T e macrófagos, de modulação da diferenciação das células plasmáticas e promoção do aumento da permeabilidade vascular (Foley et al., 2003; Abbas & Litchman, 2005).

A IL-6 é negativamente regulada pela IL-10 (Tizard, 2006). A IL-10 é um inibidor global da resposta inflamatória, inibe a activação e função dos macrófagos e linfócitos T e inibe uma série de citocinas, como a IL-12 e indirectamente o Interferão- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Abbas & Litchman, 2006). Para além disso, regula o crescimento e a diferenciação de uma variedade de células como as NK, linfócitos T auxiliares e citotóxicos (CD4+ e CD8+), células endoteliais e ainda possui um importante papel na diferenciação e função dos linfócitos Tregs (Moore, Malefyt, Coffman & O'Garra, 2001).

Gatos infectados com FCoV e sem sintomatologia desta doença, quando comparados com gatos com PIF, exibem níveis de IL-10 significativamente mais elevados (baço) (Dean et al., 2003; Kipar et al., 2006b). A IL-10 regula negativamente a expressão das integrinas  $\beta_2$  nos monócitos, reduzindo a sua capacidade de adesão às células endoteliais e de causar vasculite (Kipar et al., 2005).

Nos estudos de Dean et al. (2003) e Kipar et al. (2006b), os níveis de IL-12p40 foram significativamente mais baixos (tecidos linfáticos) nos gatos com PIF do que nos gatos SPF infectados por FCoV mas sem PIF. Dean et al. (2003), ainda verificaram que a IL-4 se encontrava diminuída em gatos infectados com o FIPV.

Estes resultados indicam que gatos infectados com FCoV que não desenvolvem PIF conseguem montar uma resposta imune específica e eficaz para o FCoV e conseguem evitar a excessiva activação de macrófagos, possivelmente devido aumento da produção de IL-10. Complementarmente, o desenvolvimento de PIF, pode ser devido à falta de IL-12 que inibe uma resposta imunitária celular efectiva e permite a activação dos monócitos e macrófagos e o derradeiro desenvolvimento da doença (Kipar et al., 2006b).

A via p38 MAPK (*mitogen activated protein kinases*), componente das vias de sinalização celular, é rapidamente activada após infecção dos monócitos com FIPV e este processo regula directamente a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Regan et

al., 2009). É possível que o TNF- $\alpha$  produzido durante a fase inicial da activação desta via possa ser a causa da activação da mesma via, mais tarde na infecção (Regan et al., 2009). O TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  aumentam a adesão dos monócitos às células endoteliais e, para além disso, estas citocinas encontram-se reguladas positivamente nos monócitos em resposta à adesão mediada pela integrina  $\beta_2$  às células endoteliais (Kipar et al., 2005). Os gatos com PIF exibem níveis de IL-1 $\beta$  significativamente mais altos quando comparando com gatos SPF, em tecidos linfáticos (Kipar et al., 2006b).

A replicação do FIPV nos macrófagos aumenta a produção de TNF- $\alpha$  aumentando a expressão do fAPN. Com isto, as células-alvo tornam-se mais susceptíveis à infecção viral por FCoV, agravando a doença (Takano et al., 2007b). Para além disso, os macrófagos infectados produzem factores de sobrevivência de neutrófilos em excesso, regulando e prolongando a sua sobrevivência (Takano et al., 2009b). O TNF- $\alpha$  é indicativo de um resultado pouco favorável no decurso da doença (Kiss et al., 2004).

Kiss e seus colegas (2004) sugeriram que a doença, independentemente da sua forma, está associada a uma forte resposta do mRNA de TNF- $\alpha$  nas células mononucleares periféricas e na falha da indução de mRNA de IFN- $\gamma$ . Os autores verificaram que os gatos imunizados falharam na regulação positiva do mRNA de TNF- $\alpha$  e um deles manifestou uma forte resposta de IFN- $\gamma$ . Assim, a resposta do mRNA do TNF- $\alpha$  tende a favorecer a imunidade humoral (T<sub>H</sub>2), enquanto que a resposta do mRNA do IFN- $\gamma$  tende a favorecer a imunidade celular (T<sub>H</sub>1).

Gelain, Meli e Paltrinieri (2006) verificaram que gatos infectados com FCoV e clinicamente saudáveis, quando comparados com gatos SPF, expressavam níveis altos de citocinas tais como IFN- $\gamma$ . Após detecção de um gato com PIF no gatil, verificaram nos restantes gatos infectados o aumento da produção de citocinas, particularmente de IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ , sugerindo o seu papel protector na doença. Na mesma linha, Giordano e Paltrinieri (2009) observaram que gatos clinicamente normais, infectados com FCoV e a viver em gatis com alta prevalência de PIF, tinham as concentrações séricas de IFN- $\gamma$  mais altas. Entre gatos com PIF e gatos clinicamente normais, infectados com FCoV, a viver em gatis com baixa prevalência de PIF as diferenças da concentração sérica de IFN- $\gamma$  não eram significativas. Além disso, a concentração de IFN- $\gamma$  era significativamente mais alta no líquido de derrame do que no soro de gatos com PIF, possivelmente devido à produção de IFN- $\gamma$  nas lesões (Berg et al., 2005). Estes dados indicam uma forte imunidade celular em gatos FCoV positivos, saudáveis.

Os resultados de Giordano e Paltrinieri (2009) sugerem que, apesar de os gatos resistentes à infecção por FCoV terem uma forte imunidade celular CMI (*cell mediated immunity*),

medida pela concentração sérica de IFN- $\gamma$ , a CMI provavelmente também está envolvida na patogénese da PIF, embora ao nível tecidual, como evidenciado pela alta concentração desta citocina no líquido de derrame. Por outro lado, Berg et al. em 2005 detectou níveis elevados de mRNA de IFN- $\gamma$  em tecidos com lesões inflamatórias de PIF indicando que a infecção não é controlada apenas pela resposta inflamatória.

Em comparação com a PIF generalizada, as elevações do nível da expressão das citocinas na PIF neurológica são muito mais consistentes, exibindo menor variabilidade (Foley et al., 2003). No estudo de Foley et al. (2003), as citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$ , *macrophage inhibitory protein* (MIP) -1 $\alpha$  e RANTES não mostraram aumento da transcrição nos cérebros dos gatos do grupo de controlo (com alterações neurológicas e sem PIF) mas mostram um ligeiro aumento em gatos com sintomatologia neurológica de PIF e ainda, um grande aumento em gatos com PIF generalizada. Já no caso do IFN- $\gamma$ , a sua expressão encontrava-se aumentada em gatos com PIF generalizada e ligeiramente diminuída em gatos com PIF com sintomatologia neurológica.

## **6. Diagnóstico**

A obtenção de um diagnóstico definitivo de PIF em vida pode ser difícil (Kennedy, 2009), dada a falta de sinais clínicos específicos, a ausência de alterações bioquímicas patognomónicas e a dificuldade na interpretação dos testes de rotina utilizados (Sharif et al., 2010b). Os animais que apresentam a forma seca da doença constituem um desafio diagnóstico superior (Kennedy, 2009). O diagnóstico baseia-se na história clínica, hematologia e outros testes diagnósticos complementares tais como a serologia e imagiologia, biópsias e PCR (Addie et al., 2009; Sharif et al., 2010b). Considerando a ausência de vacinas efectivas e de um tratamento curativo para a doença, a importância do diagnóstico reflecte-se no manejo e controlo do vírus (Sharif et al., 2010b).

### **6.1. História clínica**

A história clínica típica de gatos com PIF inclui a aquisição do animal num gatil e presença de febre ondulatória não responsiva a antibióticos (Sharif et al., 2010b). A maioria dos casos ocorre em animais jovens, com menos de um ano de idade e a doença parece ser mais comum em animais puros do que em cruzados (Kennedy, 2009).



## 6.2. Hematologia

As alterações do hemograma não são patognomónicas da afecção (Sharif et al., 2010b). A linfopenia é um achado comum, podendo ocorrer em combinação com neutrofilia (Paltrinieri et al., 1998a), compondo o “leucograma de stress” que é comum em gatos e pode ocorrer em muitas outras doenças (Addie et al., 2009; Sharif et al., 2010b). Uma contagem normal de linfócitos torna o diagnóstico de PIF menos provável (Addie et al., 2009). Também é frequente identificar-se uma anemia não regenerativa, ligeira a moderada, com hipoalbuminemia, embora estes achados também sejam comuns em muitos gatos que apresentam doenças crónicas (Pedersen, 2009a).

## 6.3. Análises bioquímicas

Outros parâmetros laboratoriais (enzimas hepáticas, bilirrubina, ureia e creatinina) podem estar variavelmente elevados, dependendo da localização da lesão nos órgãos e a sua gravidade. Consequentemente, não são parâmetros úteis para estabelecer um diagnóstico etiológico (Hartmann, 2010).

### 6.3.1. Hiperbilirrubinemia e enzimas hepáticas

A hiperbilirrubinemia e icterícia são frequentemente observadas e são, muitas vezes, reflexo de necrose hepática (Hartmann et al., 2003) apesar da actividade da fosfatase alcalina (ALP) e da alanina aminotransferase (ALT) geralmente não estarem tão aumentadas como noutras doenças hepáticas (colangiohepatite e lipidose hepática, por exemplo) (Hartmann, 2010). A hiperbilirrubinemia explica-se pelo comprometimento do metabolismo da bilirrubina e da sua excreção, dados os altos níveis de TNF- $\alpha$  que inibem o seu transporte transmembranar (Fischer, Sauter-Louis & Hartmann, 2012 a citar Zollner & Trauner, 2006).

### 6.3.2. Hiperglobulinemia e *ratio* albumina-globulina

A hiperglobulinemia é um achado importante na PIF (Addie & Jarrett, 2006), caracterizando-se por níveis elevados de globulinas- $\gamma$  e a níveis diminuídos de albumina (Paltrinieri, Grieco, Comazzi & Cammarata Parodi, 2001). O *ratio* albumina-globulina (A:G) é uma ferramenta útil no diagnóstico, especialmente quando determinado no líquido de derrame (Addie & Jarrett, 2006) e tem maior valor diagnóstico do que a concentração isolada de proteínas totais ou globulinas- $\gamma$  (Hartmann, 2010). Os níveis baixos de albumina estão geralmente associados à diminuição da sua síntese por insuficiência hepática, à perda de proteínas causada por glomerulopatia secundária à deposição de complexos imunes ou pelo extravasamento de líquido rico em proteínas causado pela vasculite (Hartmann et al., 2003).

Quando esta relação se aproxima de 0,5 o diagnóstico de PIF é mais provável (Hartmann et al., 2003). É possível que a estimulação dos linfócitos B pela IL-6, produzida no decorrer da doença, também contribua para o aumento das globulinas- $\gamma$  (Hartmann et al., 2003). Na electroforese das proteínas séricas, as alterações mais consistentemente observada são o aumento das globulinas  $\alpha_2$  e  $\gamma$  (Paltrinieri et al., 1998a). O título de anticorpos e a hipergamaglobulinémia parecem correlacionar-se mas a grande variação dos títulos de anticorpos anti-FCoV, a uma dada concentração de globulinas- $\gamma$ , indica a ocorrência de reacções autoimunes adicionais. A electroforese tem valor limitado na PIF por não diferenciar a doença de doenças tumorais, por exemplo (Hartmann, 2010). Apesar disso, deve-se suspeitar de PIF quando este teste revela uma hipergamaglobulinémia policlonal (Addie & Jarrett, 2006).

#### 6.3.3. Proteínas de fase aguda

Para além das concentrações elevadas de globulinas, ocorre também o aumento das proteínas de fase aguda (APPs) (Kennedy, 2009). As APPs são um grupo grande e variado de glicoproteínas no soro, cujas concentrações aumentam (ou diminuem) durante certos processos inflamatórios (Sharif et al., 2010b). A concentração de APPs como a glicoproteína ácida felina  $\alpha_1$  (fAGP) e a soro amilóide A (SAA) podem ser medidas para facilitar o diagnóstico (Sharif et al., 2010b; Giori, Giordano, Giudice, Grieco & Paltrinieri, 2011). Apesar do aumento da fAGP não ser específico de PIF, valores superiores a 1,5g/l no plasma e no líquido de derrame verificam-se usualmente nesta doença (Saverio, Alessia, Vito & Stefano, 2007), auxiliando a distinção de outras doenças clinicamente semelhantes mas não inflamatórias, como a cardiomiopatia e neoplasias (Addie & Jarrett, 2006; Saverio et al., 2007). Deve-se ter em conta que a fAGP pode estar aumentada em gatos infectados com FCoV mas assintomáticos (Paltrinieri et al., 2007). Gatos com PIF têm um aumento de SAA dez vezes superior do que gatos expostos ao FCoV (Giordano, Spagnolo, Colombo & Paltrinieri, 2004). Para esta APP, as concentrações de referência são inferiores a 20  $\mu$ g/ml e gatos com PIF têm valores até 80  $\mu$ g/ml (Addie & Jarrett, 2006).

#### 6.4. Análise do fluído de derrame

Caso haja líquido de derrame, a sua análise é um passo importante para o diagnóstico já que os testes efectuados neste material têm maior valor diagnóstico do que os efectuados no sangue (Hartmann et al., 2003; Addie et al., 2009). Geralmente, o líquido de derrame é de um amarelo claro a escuro e ocasionalmente é tingido de verde, dados os elevados níveis de bilirrubina ou biliverdina, respectivamente (Pedersen, 2009a). O fluido pode ser

límpido ou turvo e muitas vezes são visíveis cordões de fibrina (Sharif et al., 2010b). É viscoso devido ao alto teor proteico (Kennedy, 2009), superior a 3,5 g/dl, e consistente com um exsudado embora o seu conteúdo celular seja baixo (<5000 células nucleares/ml), aproximando-se de um transudado modificado (Hartmann, 2010). Menos frequentemente, pode apresentar-se rosado ou quiloso (Addie & Jarrett, 2006).

A avaliação citológica do fluído de derrame em gatos com PIF caracteriza-se pela presença de macrófagos e neutrófilos num fundo proteináceo denso. É possível que se identifiquem também linfócitos e células plasmáticas (Sharif et al., 2010b). A citologia não é específica e a sua importância reside na possibilidade de excluir outras doenças (Giori et al., 2011) porque, apesar das características do derrame, existem outras doenças com efusões semelhantes, tais como o linfoma, a insuficiência cardíaca, a colangiohepatite, a peritonite bacteriana ou a pleurite (Hartmann, 2010).

#### 6.4.1. Teste de Rivalta

A par da citologia, este teste também é útil para diferenciar o líquido de derrame devido a PIF do líquido de derrame com outras causas (Hartmann et al., 2003). O princípio do teste baseia-se na formação de um precipitado proteico em pH ácido, permitindo a distinção entre um exsudado e um transudado (Fischer et al., 2012), isto porque o resultado positivo se deve ao alto teor proteico, alta concentração de fibrina e de mediadores inflamatórios presentes no fluído (Hartmann, 2010). Apesar disso, podem ocorrer resultados falsos positivos no caso de linfoma ou de peritonite bacteriana. Segundo Hartmann e seus colegas (2003), este teste tem um alto valor predictivo positivo (VPP) (86%) e um alto valor predictivo negativo (VPN) (96%).

#### 6.5. Análise do líquido cefalorraquidiano na PIF neurológica

A análise ao líquido cefalorraquidiano (LCR), em animais com envolvimento do SNC, mostram resultados semelhantes, embora mais variáveis, no aumento de proteínas e leucócitos (Paltrinieri et al., 2001; Pedersen, 2009a). Na PIF, o LCR geralmente apresenta concentrações de proteínas superiores a 200 mg/dl e contagem de leucócitos superior a 100 células/ $\mu$ l, consistindo predominantemente em neutrófilos ou linfócitos (Foley et al., 1998; Diaz & Poma, 2009). Apesar disso, estes valores não são específicos e animais com PIF e alterações nervosas podem também ter uma análise normal do LCR (Boettcher et al., 2007).

#### **6.6. Anticorpos séricos e do líquido derrame**

A medição do título de anticorpos no soro é utilizada para detectar a infecção pelo FCoV mas, como referido anteriormente, uma grande percentagem de animais saudáveis terá resultados positivos, tornando este método mais adequado para o manejo da infecção. Assim, a presença de anticorpos não é um diagnóstico definitivo e a ausência dos mesmos também não exclui a doença (Hartmann et al., 2003).

O título de anticorpos só tem valor diagnóstico se os métodos laboratoriais utilizados foram fidedignos e consistentes. Os testes incluem a imunofluorescência indirecta (Kummrow et al., 2005; Pratelli, 2008), a neutralização viral e o *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), considerado o mais sensível por Pratelli (2008).

Valores baixos e médios de anticorpos não têm valor diagnóstico e valores elevados aumentam a probabilidade do desenvolvimento da doença (Hartmann et al., 2003). Gatos com PIF fulminante parecem ter títulos de anticorpos diminuídos, este facto pode dever-se à ligação dos anticorpos a altas concentrações de antigénio, tornando-os indisponíveis para o teste (Hartmann, 2010). Meli e colegas (2013) concluíram que os testes disponíveis para a determinação dos títulos de anticorpos podem ter resultados erroneamente baixos ou mesmo negativos em amostras com concentração viral muito alta.

No estudo de Hartmann e colegas (2003), a medição do título de anticorpos nas efusões teve resultados de VPP e de VPN elevados.

#### **6.7. Detecção de anticorpos no LCR**

Foley et al. (1998) relacionaram a presença de anticorpos no LCR em animais com PIF. Já Boettcher e colegas (2007) não encontram diferenças significativas em gatos com sintomatologia nervosa devido a PIF quando comparados com gatos com outras doenças neurológicas. Este teste é considerado tão ambíguo como a medição de anticorpos no soro, pelo que não é recomendado (Addie et al., 2009).

#### **6.8. Identificação do vírus por análise molecular**

Os testes utilizados para detectar RNA do FCoV partilham algumas das fragilidades dos testes serológicos ao não identificarem definitivamente animais com PIF (Hartmann et al., 2003), podendo levar a interpretações erróneas dos resultados obtidos. Os testes de detecção de ácidos nucleico têm ainda a desvantagem de serem muito susceptíveis à contaminação laboratorial com produtos amplificados de DNA (Pedersen, 2009a). Por outro lado, têm a vantagem de detectar a infecção viral que está a ocorrer, ao contrário da serologia que detecta que houve um contacto prévio com o vírus.

Existem vários ensaios de RT-PCR para este vírus, variando na região amplificada do genoma. Alguns utilizam *primers* para as regiões conservadas do genoma, tais como a Pol (Dye et al., 2008), o gene 7b (Brown et al., 2009; Lin et al., 2009a) e a UTR 3' (Herrewegh et al., 1995; Addie et al., 2003; Hartmann et al., 2003; Duarte et al., 2009; Soma et al., 2013). A sensibilidade do RT-PCR pode ser aumentada utilizando um *real time* RT-PCR (RTqPCR), como utilizado por Dye et al. (2008) e Barker et al. (2013), por exemplo. A partir da amplificação do gene S, podem-se diferenciar os serótipos I e II (Addie et al., 2003).

Simons e seus colegas (2005) desenvolveram um protocolo para detectar apenas as formas transcriptionalmente activas do vírus no sangue, através da utilização de *primers* para a amplificação do mRNA do gene M. Deste modo, a detecção positiva identificaria a replicação viral nos monócitos e macrófagos.

Numa tentativa de aperfeiçoamento do ensaio anterior, em 2012, Hornyák e seus colegas, desenvolveram um novo método de RTqPCR que detecta um largo espectro de variantes do FCoV, amplificando o mRNA subgenómico do gene M, através da sonda-*primer* de transferência de energia (P-sg-QPCR), com a finalidade de encontrar as várias mutações do vírus.

A análise molecular tem sido utilizada para detectar o vírus em amostras fecais, sendo uma forma sensível para determinar se os animais (saudáveis ou não) estão a excretar o vírus nas fezes (Pedersen et al., 2008, 2009b; Kipar et al., 2010; Vogel et al., 2010), ou seja, o seu estatuto de portadores na população. O vírus também pode ser detectado no líquido de derrame (Herrewegh et al., 1995; Sharif et al., 2010a; Soma et al., 2013) e em diversos órgãos (Kipar et al., 2010). A presença do FCoV, determinada por *real time* RT-PCR, foi identificada em órgãos como: fígado, linfonodos mesentéricos, timo, rins, tonsilas, pulmão, baço, medula óssea, cérebro, pele e músculo esquelético (Kipar et al., 2010). Este estudo demonstra que a virémia do FCoV leva à infecção dispersa em vários órgãos e subsequentemente à posterior persistência do vírus. O PCR utilizando LCR mostrou ter baixa sensibilidade e apenas 67% dos gatos suspeitos de PIF neurológica foram positivos no PCR ao cérebro (Foley et al., 1998).

Com isto, tendo em conta que os *primers* utilizados para detectar o FCoV em animais doentes também amplificam os segmentos virais em gatos saudáveis (Herrewegh et al., 1995; Hartmann et al., 2003), os resultados da análise molecular devem ser interpretados em conjunto com o estado hígido do animal, não servindo como teste único de diagnóstico de PIF.

Existem várias explicações para os resultados falsos negativos, quando não há detecção viral embora haja infecção, tais como a degradação do RNA antes do ensaio, a falha na

reação de transcrição reversa que precede o PCR e a variação nucleotídica das sequências do vírus. Por outro lado, os falsos positivos podem ocorrer pela presença de infecções por CCV já que as regiões conservadas são semelhantes (Addie et al., 2003; Brown et al., 2009).

#### **6.9. Análise do humor aquoso**

A análise do humor aquoso como meio de diagnóstico da PIF não faz parte dos protocolos de diagnóstico comuns e raramente é referida na literatura. Recentemente, Wiggans, Vernau, Lappin, Thomasy e Maggs (2013) testaram amostras de humor aquoso de gatos com PIF diagnosticada. A citologia revelou inflamação supurativa ou piogranulomatosa de gravidade leve a moderada com escassos linfócitos reactivos e células plasmáticas. A partir de RT-PCR não foi detectado RNA do vírus, embora num animal se tenha detectado RNA viral no sangue, sugerindo que o facto de não se encontrar RNA no humor aquoso não exclui o diagnóstico de PIF.

#### **6.10. Achados imagiológicos**

As radiografias podem revelar a presença de derrames pleurais, peritoneais e/ou pericárdicos e ainda hepatomegália ou renomegália (Sharif et al., 2010b). A ecografia abdominal fornece informação adicional sobre a estrutura dos órgãos, possível linfadenopatia e é superior na detecção de derrames abdominais do que as radiografias (Lewis & O'Brien, 2010). Descobertas adicionais que incluem o contorno renal irregular, hipocogenecidade subcapsular, derrame peritoneal ou retroperitoneal e alterações intestinais difusas devem aumentar o grau de suspeita de infecção por FIPV (Lewis & O'Brien, 2010). A ressonância magnética (MRI, *Magnetic resonance imaging*) pode revelar, em especial, dilatação ventricular e hidrocefalo em gatos com PIF neurológica (Foley et al., 1998).

#### **6.11. Histopatologia**

A histopatologia é considerado o único método para obter um diagnóstico definitivo (Pedersen, 2009a). Corando amostras de tecido lesionado com Hematoxilina e Eosina (H&E) em gatos com PIF é possível encontrar inflamação localizada com macrófagos, neutrófilos, linfócitos e células plasmáticas (Sharif et al., 2010b). As lesões vasculares encontram-se rodeadas por uma proliferação de células inflamatórias, o que é característico da forma húmida da doença. Os piogranulomas estão geralmente associados a necrose fibrinosa e podem ser grandes e consolidados ou pequenos e numerosos (Kipar et al.,

2005). Acumulações focais de células inflamatórias e lesões necróticas proliferativas são típicas das lesões da forma húmida da PIF. A formação da lesão foi descrita com maior detalhe no capítulo da Patogénese.

#### 6.11.1. Imunofluorescência e imunohistoquímica

A detecção da presença de vírus, através da demonstração do antígeno nos macrófagos presentes no líquido de derrame ou nas lesões suspeitas de PIF é efectuado por imunofluorescência (FA) ou imunohistoquímica (IHQ), respectivamente (Addie et al., 2009; Pedersen, 2009a). A IHQ é mandatória para auxiliar a confirmação ou exclusão da doença em situações duvidosas (Giori et al., 2011).

Hartmann et al. (2003) realizou um ensaio de imunofluorescência em líquido de derrame e o resultado foi 100% predictivo de PIF, ou seja, não houve falsos positivos. Já o VPN foi baixo (57%), o que se pode explicar pela pequena quantidade de macrófagos presentes nos esfregaços obtidos. A detecção do antígeno de coronavírus nas efusões de PIF é muito específica mas menos sensível do que a detecção dos antígenos virais nas características lesões parenquimatosas (Pedersen, 2009a). Nesta técnica são utilizado anticorpos anti-FCoV acoplados a isotiocianato de fluoresceína e, após aplicação do protocolo, a fluorescência é observada num microscópio que filtra todos os comprimentos de onda excepto o esperado permitindo a visualização da fluorescência (Murphy et al., 1999).

A detecção de antígenos de FCoV por IHQ provou ser 97% predictiva em casos positivos (Tammer, Evensen, Lutz & Reinacher, 1995). A desvantagem do método é a necessidade de métodos invasivos para a recolha de amostras de tecidos por laparoscopia ou laparotomia (Addie et al., 2009).

Ives et al., (2013), reportaram pela primeira vez o uso de IHQ em amostras de LCR para o diagnóstico de PIF neurológica com a vantagem de não ser necessária a colheita de amostras por biópsia. Este método carece ainda de estudos sobre especificidade e sensibilidade. Na IHQ, são utilizados anticorpos, mono- ou policlonais, acoplados a *horseradish peroxidase* aos quais é adicionado peróxido de hidrogénio com um derivado de benzidina que vai formar um precipitado insolúvel colorido (Murphy et al., 1999).

## **7. Tratamento**

Todos os gatos com PIF confirmada irão perecer da doença (Hartmann, 2010). Mesmo assim, os animais com sinais clínicos mais moderados podem sobreviver durante vários meses com alguma qualidade de vida proporcionada pelo tratamento. No entanto, quando o estado hígido do animal declina e este perde peso e deixa de comer, o dono deve estar preparado para a realidade de que o seu animal está a morrer (Hartmann, 2010).

Existem relatos de curas espontâneas sem tratamento em animais com diferentes sinais clínicos (Pedersen et al., 2009a). O tratamento sintomático tem tido como objectivo o controlo da resposta imunitária através da sua supressão e modulação (Hartmann & Ritz, 2008). Existem uma série de estudos publicados sobre este assunto mas, até agora, nenhum fármaco provou ser eficaz na cura da doença.

### **7.1. Tratamento imunossupressor**

Segundo Hartmann (2010), em quase todos os estudos publicados em relação ao tratamento da PIF, foram utilizados glucocorticóides. No entanto, não existem estudos controlados que avaliem o seu verdadeiro efeito nesta doença (Hartmann & Ritz, 2008). Fármacos imunossupressores como a prednisonola (2 a 4 mg/kg q24h PO) ou a ciclofosfamida (2 a 4 mg/kg 4 vezes por semana PO) podem atrasar a progressão da doença (Hartmann, 2010). Alguns animais beneficiam da drenagem do líquido de derrame seguida de injeção de dexametasona na cavidade abdominal ou torácica (1 mg/kg q24h até que cesse a produção de líquido) (Hartmann, 2010). Também se deve incluir no tratamento a administração de antibióticos de largo espectro (ex. ampicilina, 100 mg/kg q24h) (Hartmann & Ritz, 2008) para evitar o aparecimento de infecções bacterianas secundárias e realizar uma terapêutica de suporte (por exemplo, administração de fluidos).

A prednisolona tem como vantagens a segurança, fazer os animais sentirem-se melhor e estimular o apetite. Tem ainda a vantagem de ser o tratamento da colangite linfocítica que pode ser confundida com a PIF (Addie & Jarrett, 2006).

Em 2011, Fischer, Ritz, Weber, Sauter-Louis e Hartmann avaliaram o uso da pentoxifilina, inibidor de TNF- $\alpha$  derivado da metilxantina, na diminuição da vasculite e por tal, no aumento da duração e qualidade de vida de gatos com PIF. Ao contrário do observado pelos médicos veterinários que a prescreviam, não encontraram efeito em nenhum dos parâmetros avaliados.



## 7.2. Tratamento imunomodulador

Os imunomoduladores são também prescritos sem que se tenha comprovado a sua eficácia num ambiente controlado. Tem sido sugerido que estes agentes restabelecem a função imune comprometida, permitindo que o paciente controle a carga viral, recuperando da sintomatologia. No entanto, uma estimulação não específica do sistema imunitário pode ser contra-indicado, uma vez que os sinais clínicos surgem e progridem como resultado de uma resposta imunomediada (Hartmann & Ritz, 2008). A tilosina e promodulina são exemplos de moléculas utilizadas, a primeira com relativa popularidade em estudos, embora em nenhum tenha havido um diagnóstico definitivo de PIF (Hartmann & Ritz, 2008).

Em 2009, Legendre e Bartges, testaram um poliprenil imunoestimulante em três gatos com a forma seca da doença. Os seus resultados foram positivos, prolongando o tempo de vida dos animais e diminuindo a gravidade dos sintomas. O poliprenil é um fármaco sob investigação que faz uma regulação ascendente da expressão do mRNA dos linfócitos T auxiliares.

## 7.3. Tratamento antiviral

Tal como nos pontos anteriores, a procura por um tratamento antiviral eficaz ainda não foi bem sucedida. Por exemplo, a ribavirina inibe o FIPV *in vitro* mas não *in vivo*, para além de ser extremamente tóxica para os gatos (Addie et al., 2009).

O uso de interferões tem sido frequente. Os gatos podem ser tratados parentericamente com interferões felinos durante longos períodos de tempo sem que desenvolvam anticorpos (Hartmann, 2010). O interferão  $\alpha$  humano e o interferão  $\omega$  felino têm efeito antiviral (Hartmann, 2010) mas, apesar da sua utilização, o IFN- $\omega$  felino recombinante foi considerado não eficaz no aumento da duração e da qualidade de vida dos animais (Ritz, Egberink & Hartmann, 2007).

McDonagh, Sheehy e Norris (2011) demonstraram o efeito inibitório da replicação *in vitro* de *small interfering* RNAs, num potencial tratamento para a PIF. O efeito inibidor da ciclosporina A na replicação do FCoV *in vitro* foi observado mas ainda são necessários mais estudos para a aplicação prática deste imunossupressor em animais com PIF (Tanaka et al., 2012; Tanaka, Sato & Sasak, 2013).

Recentemente foi referido o papel antiviral da cloroquina e Takano, Katoh, Doki e Hohdatsu (2013) estudaram a possibilidade do seu uso para o tratamento da PIF *in vivo* e *in vitro*. Demonstraram que (*in vitro*), o fármaco inibe a replicação viral do FIPV e tem propriedades anti-inflamatórias. Apesar de *in vivo*, os animais tratados com cloroquina terem tido

melhores resultados clínicos do que o grupo de controlo, os seus níveis de ALT aumentaram, um efeito não desejado.

#### **7.4. Monitorização do tratamento e prognóstico**

Independentemente do tratamento eleito é importante monitorizar o progresso do animal. Para cumprir esse objectivo devem ser feitas avaliações regulares do hematócrito, globulinas, *ratio* A:G, AGP e peso do animal a cada 7 ou 14 dias (Addie & Jarrett, 2006).

O prognóstico da PIF é bastante reservado. Alguns parâmetros podem ser utilizados para prever o tempo de sobrevivência do animal, que no caso de um baixo valor de Karnofsky (índice de qualidade de vida modificado para gatos), baixa contagem de plaquetas, baixa contagem de linfócitos, concentração alta de bilirrubina e grande quantidade de líquido de derrame indicam um fraco prognóstico (Hartmann & Ritz, 2008). Quando os sinais negativos começam a progredir e a qualidade de vida do animal é posta em causa, a eutanásia deve ser considerada (Addie & Jarrett, 2006).

### **8. Controlo e Maneio**

Sabe-se que a principal forma de transmissão do FCoV entre os gatos é a fecal-oral e, por tal, a PIF é um problema quando nos referimos a um ambiente com múltiplos gatos. As medidas de prevenção a utilizar com vista à redução da infecção centram-se maioritariamente seguindo regras de higiene específicas e a manutenção dos animais numa organização adequada, consoante o tipo de ambiente em questão.

#### **8.1. Ambiente com múltiplos gatos**

Existem algumas estratégias para tentar eliminar o FCoV destes recintos, como a redução do número de gatos e a conservação das superfícies potencialmente contaminadas pelo vírus limpas. Casas com menos de 5 gatos podem naturalmente tornar-se livres do FCoV, já em casas com mais de 10 gatos será praticamente impossível que isto ocorra já que o vírus se transmite facilmente entre os animais. O melhor método para eliminar a exposição dos animais ao agente é a medição do nível de anticorpos e a aplicação de uma correcta segregação dos indivíduos (Hartmann, 2010).

#### **8.2. Gatis de reprodução**

Baseado no conhecimento de que os gatinhos possuem imunidade materna contra o vírus até às 5 ou 6 semanas de idade (Addie et al., 2009), existe um protocolo de desmame precoce para a prevenção da infecção dos gatinhos pelas mães. A sua aplicação consiste

no isolamento, 2 a 3 semanas antes do parto, com quarentena restrita das mães e dos gatinhos e desmame às 4 a 6 semanas de idade (Addie, Paltrinieri & Pedersen, 2004). Apesar de parecer uma prática simples de cumprir, este método exige a existência de diferentes instalações de quarentena e o cumprimento de procedimentos de manejo dos animais que impeçam a entrada do vírus, para além de ter que ser aplicado num pequeno número de animais (<5) (Addie et al., 2004). Por outro lado, o desmame precoce não é aconselhado por alguns criadores, uma vez que cruza o período de estabelecimentos de laços sociais do gatinho, que se dá entre as 2 e as 7 semanas de vida.

### **8.3. Abrigos de recuperação**

Neste caso a prevenção da PIF e da infecção é virtualmente impossível. O isolamento dos animais não é eficaz e o vírus é facilmente transportado nas roupas, sapatos, pó e entre os animais (Hartmann, 2010). São requeridas boas práticas para evitar a dispersão do vírus nos gatis e estas incluem a redução da contaminação fecal do ambiente através da existência de um número adequado de areões em relação ao número de animais, limpeza e desinfecção frequente dos mesmos e sua disposição longe da comida e água; o número de animais deve ser inferior a 10, no qual os animais se incluem em grupos estáveis de 3 ou 4 indivíduos; a testagem para a presença de vírus ou anticorpos deve ser efectuada antes da entrada de um novo elemento no abrigo cujo resultado deverá ser negativo para a presença de FCoV. Caso existam gatas gestantes, o protocolo utilizado deverá ser o referido nos “Gatis de reprodução” (Addie & Jarrett, 2006).

### **8.4. Vacinação**

Têm existido muitas tentativas para desenvolver uma vacina mas nunca nenhuma se provou eficaz, em parte devido ao fenómeno de ADEI.

Actualmente, existe apenas uma vacina e esta não é comercializada em Portugal (Primucell®FIP, Pfizer®). É uma vacina intranasal, que deve ser administrada a gatos saudáveis, a partir das 16 semanas de idade e que sejam seronegativos ao FCoV. Esta integra um mutante termosensível do coronavírus felino, permitindo a sua replicação nas vias respiratórias superiores mas não a nível sistémico, onde se verificam temperaturas superiores. Desta forma, a estirpe restringe-se às vias respiratórias superiores induzindo o desenvolvimento de imunidade protectora local (IgA, Imunoglobulina A) e também da imunidade celular (Pfizer Animal Health Information, 2008).

Apesar de parecer uma vacina útil, a sua segurança e eficácia têm sido questionadas (Addie & Jarrett, 2006). As dúvidas sobre a eficácia residem no facto de a vacina conter uma

estirpe com o serótipo menos prevalente em campo, o tipo II. As questões levantadas sobre a sua utilidade em locais onde a infecção é endémica e os animais são seropositivos, prendem-se na impossibilidade de aplicar a vacina onde é mais necessária.

A vacina não é considerada nuclear (Addie et al., 2009) e é mesmo não recomendada pelo *Vaccination Guidelines Group* da *World Small Animal Veterinary Association* (2010). Caso a sua utilização seja considerada, a primovacinação deverá ser efectuada a partir das 16 semanas de vida, com reforço 3 a 4 semanas depois e revacinação anual. Caso seja aplicada a um animal adulto, são recomendadas duas vacinações com intervalo de 3 a 4 semanas, com revacinação anual já não se conhece a duração da imunidade que confere.



### III. TRABALHO PRÁTICO

#### 1. Introdução/Objectivos

A infecção de felinos pelo coronavírus felino (FCoV) tem uma prevalência de 80 a 90% e pode ser assintomática ou pode manifestar-se através de quadro sintomatológico gastrointestinal; no entanto, em 5 a 12% destes animais a infecção pode evoluir para a Peritonite Infecciosa Felina (Vogel *et al.*, 2010; Brown, 2011) (PIF). Clinicamente, esta doença pode apresentar-se através de uma forma seca ou de uma forma húmida.

As explicações para o porquê da infecção se tornar fatal, o porquê de clinicamente tomar um rumo ou o outro, são diversas e frequentemente as ideias e estudos cruzam-se e as conclusões, por vezes, são inconstantes. No entanto, o sistema imunitário do indivíduo no qual ocorre a infecção tem um papel fundamental no desenvolvimento da doença e no seu combate mas, devido à sua complexidade, é difícil clarificar a sua resposta face ao FCoV.

A partir do estudo da expressão de mediadores da resposta pró e anti inflamatória, pretendeu-se avaliar a resposta imunitária de vários animais, nos quais a presença de FCoV tinha sido previamente confirmada, com ou sem sintomatologia suspeita de PIF.

Da amostra inicial foi determinada a carga viral e feita a subtipificação viral das amostras biológicas. O grupo inicial de indivíduos da amostra foi dividido em três grupos clínicos, respeitando diferenças na sintomatologia apresentada e nos resultados de exames complementares de diagnóstico. Assim, a divisão foi organizada em Grupo I – animais positivos a FCoV, sem suspeita de PIF; Grupo II – animais positivos a FCoV, com sintomatologia gastrointestinal suspeita de PIF e Grupo III – animais positivos a FCoV, com sintomatologia ocular e de SNC suspeita de PIF. Nestes grupos foi feita a quantificação da expressão dos mediadores inflamatórios (IL-10, IL-4, IL-12p35, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) de forma a caracterizar a resposta inflamatória e relacioná-la com a carga viral e subtipificação viral obtidas neste trabalho.

Como resultado final deste trabalho pretendeu-se identificar um padrão na resposta imunitária face ao FCoV, que possa vir a ser útil na clarificação do prognóstico da infecção.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Caracterização da amostra (N=31)**

Os animais que compõem a amostra apresentaram-se à consulta no Hospital Veterinário Escolar e/ou em Clínicas Veterinárias. Após avaliação clínica foi realizada a colheita de material biológico, por suspeita de PIF ou para rastreio viral, no período compreendido entre Março de 2011 e Março de 2013. Todas as amostras foram processadas e analisadas no Laboratório de Virologia e Imunologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (LVI, FMV-UL).

Sempre que possível, foram recolhidas as informações referentes aos animais, incluindo dados do animal, história clínica e/ou exames complementares de diagnóstico.

### **2.2. Recolha de amostras biológicas**

Os materiais biológicos utilizados no presente estudo incluíram zaragatoas rectais, fezes, sangue total, líquido de derrame torácico e líquido de derrame abdominal, recolhidos no momento da consulta e/ou durante o internamento hospitalar.

Após colheita, as zaragatoas rectais foram colocadas em tubos secos. As amostras de sangue foram recolhidas das veias cefálica, femoral ou jugular e transferidas para tubos EDTA. Dos animais que apresentavam derrame torácico e/ou abdominal, foi feita colheita por toracocentese e/ou abdominocentese, respectivamente, para tubo seco.

Todas as amostras, após colheita, foram refrigeradas a 4°C até processamento.

### **2.3. Processamento das amostras**

Tanto as zaragatoas rectais como as amostras de fezes foram homogeneizadas em 300 µl de Tampão Fosfato Salino (PBS) e centrifugadas a 16.000 xg, durante 10 minutos, para recolha do sobrenadante. As amostras de sangue total foram centrifugadas a 2.400 xg, durante 10 minutos, para separação do plasma e das células sanguíneas. Em seguida, procedeu-se à extracção de ácido nucleico viral dos materiais, cumprindo o protocolo adequado.

### **2.4. Extracção de ácido nucleico**

A extracção de ácido nucleico viral foi realizada utilizando os *kits* QIAmp Viral RNA ou QIAmp RNA Blood (Qiagen, Alemanha), segundo as instruções do fabricante.

No caso dos homogeneizados rectais e do plasma (QIAmp Viral RNA), o RNA viral foi extraído de 140 µl de amostra à qual se adicionou 560 µl de tampão de lise (AVL) e 5,6 µl de

RNA *carrier*. Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, foram adicionados 560 µl de ETOH para precipitação do RNA e este foi colocado numa coluna de sílica. Após duas lavagens sucessivas com os tampões presentes no *kit* (AW1 e AW2), para remoção de contaminantes, o ácido nucleico viral fixo na coluna foi eluído com o tampão AVE.

O *pellet* celular obtido após centrifugação do sangue total foi utilizado para a extracção de RNA total com o *kit* QIAmp RNA Blood (Qiagen, Alemanha). A lise selectiva dos glóbulos vermelhos foi efectuada pela adição de 5 volumes de tampão EL e incubada em gelo durante 10 a 15 minutos. Os glóbulos brancos foram recuperados após centrifugação a 400 xg, durante 10 minutos a 4°C, e posteriormente lisados pela adição de 350 µl de tampão de lise (RLT). Após adição de 350 µl de ETOH a 70%, o precipitado foi aplicado numa coluna com uma membrana de sílica para retenção selectiva do RNA. Após lavagens sucessivas com tampões apropriados (RW1 e RPE), o RNA foi eluído com água.

Todas as extracções foram quantificadas no final do processo por espectrofotometria, utilizando o NanoDrop 2000c (*Thermo Scientific*) e conservadas a -80°C.

## **2.5. Quantificação viral de FCoV**

Para a quantificação viral do FCoV presente nas amostras rectais, fecais e de líquido de derrame, o RNA viral extraído foi submetido a RTqPCR (*Reverse-transcriptase real time polymerase chain reaction*). Após transcrição reversa do RNA para cDNA utilizando uma transcriptase reversa, o cDNA é amplificado utilizando pares de *primers* específicos. O conceito mais importante do processo de *real time* detém-se no facto da amplificação ser detectada e quantificada à medida que a reacção ocorre em tempo real, através da emissão de fluorescência. Existem várias técnicas de *real time* PCR e a utilizada para a quantificação viral das amostras apresentadas foi a TaqMan® da *Applied Biosystems*. Esta requer a hibridação de um oligonucleótido fluorogénico específico (sonda FAM 5'; TAMRA 3'), para além dos *primers* utilizados para a amplificação. A sonda é complementar a uma zona específica da cadeia de DNA e possui um *reporter* (emissor de fluorescência - FAM) na extremidade 5' e um *quencher* na extremidade 3' (TAMRA). Enquanto a sonda se mantém intacta, o *quencher* absorve a emissão de fluorescência emitida pelo *reporter*, extinguindo-a. Na fase de extensão do ciclo de PCR a sonda é hidrolisada pela actividade de exonuclease 5'→ 3' da Taq DNA polimerase. Nesta altura, a emissão da fluorescência já não é eficazmente absorvida pelo *quencher*, dada a separação física entre os dois, resultando num aumento acumulativo de fluorescência proporcional ao produto amplificado (Heid, Stevens, Livak & Williams, 1996; VanGuilder, Vrana, & Freeman, 2008).



A região alvo do RTqPCR utilizado localiza-se na ORF7b, situada no extremo 3' do genoma viral (Herrewegh et al., 1995) que codifica uma glicoproteína não estrutural (Lin et al., 2009a). O fragmento amplificado possui 66 pb.

A quantificação foi realizada a partir da recta-padrão efectuada pelo *software* do termociclador em tempo real, com base nos *Cycle Threshold* (Ct) das diluições seriadas de um plasmídeo recombinante de massa conhecida, cujo *insert* inclui a região amplificada.

A conversão da massa/unidade de volume (µl) do plasmídeo em moléculas/unidade de volume (µl) foi efectuada com a seguinte fórmula:

$$\frac{x \text{ g/}\mu\text{l de DNA}}{\text{dimensão do plasmídeo pb} \times 660} \times 6,022 \times 10^{23} = y \text{ moléculas/}\mu\text{l}$$

O *software* do aparelho, com base na recta-padrão e a partir do Ct de cada amostra, calcula a carga viral, expressa em moléculas/µl. Só foram consideradas para quantificação amostras com Ct inferior a 38-40 ciclos.

A amplificação foi realizada no aparelho StepOne Plus™ (Applied Biosystems®), utilizando o *Kit* TaqMan® RNA-to-Ct™ 1-Step (Applied Biosystems®, Portugal) com 3 µl de *template* e os *primers forward*, *reverse* e sonda (FAM 5'; TAMRA 3') nas concentrações de 0,3 µM, 0,9 µM e 0,25 µM, respectivamente (Tabela nº 3). Foi utilizado o protocolo de amplificação *standard* para o aparelho referido (Tabela nº 4).

Tabela nº 3 – *Primers* e sonda utilizados no RTqPCR para diagnóstico e quantificação viral de FCoV e dimensão do fragmento obtido (LVI, FMV/UTL).

Vírus	<i>Primers</i>	Sequência (5'→3')	Dimensão do fragmento
FCoV	<i>Forward</i>	TGGTCATCGCGCTGTCTACT	66 pb
	<i>Reverse</i>	AGGGTTGCTTGACCTCCTATTACA	
	Sonda	<b>FAM</b> TTGTACAGAATGGTAAGCAC <b>TAMRA</b>	

Tabela nº 4 – Ciclos térmicos utilizado no protocolo de quantificação viral em RTqPCR.

Transcrição Reversa	Desnaturação	<i>Annealing</i>	Extensão
48°C/ 15 min	95°C/ 10 min	90°C/ 15 seg	60°C/ 1 min
50 ciclos			

## 2.6. Subtipificação de FCoV

Para a diferenciação entre os tipos I e II do FCoV, o RNA viral extraído de origem rectal, fecal e de líquido de derrame foi sujeito a amplificação através de RT-PCR (*Reverse transcription polymerase chain reaction*), seguida de um *nested* PCR (nPCR), segundo a técnica descrita por Addie et al. em 2003.

No passo de transcrição reversa (RT), tendo RNA viral como *template*, obteve-se cDNA através da transcrição do gene S utilizando o *primer* reverso lubs universal para os dois tipos de FCoV I e II. A primeira ronda de PCR realizou-se com o *primer* lubs e com dois *primers forward* específicos para a sequência do gene S de FCoV (lffs) ou de CCoV (lcfs), resultando em fragmentos com diferentes dimensões dependendo da identidade do coronavírus (376 pb tratando-se do tipo I e 283 tratando-se do tipo II). De forma a aumentar a sensibilidade e especificidade da reacção, o produto da primeira reacção foi reamplificado (*nested PCR*), com um *primer reverse* universal (nlubs) e dois *primers forward* (nlffles e nlcfs) (Tabelas nº 5 e 6). Desta reacção resultou um fragmento de 360 pb no caso do tipo I ou num fragmento de 218 bp para o tipo II (Addie et al., 2003) (Figura nº 4).

Figura nº 4 – Esquema do RT-PCR para distinção dos tipos I e II de FCoV. Legenda dos *primers* utilizados: 1 – lubs, 2 – lcfs, 3 – lffs, 4 – nlubs, 5 – nlcsf, 6- nlffles. Adaptado de Addie et al., 2003.

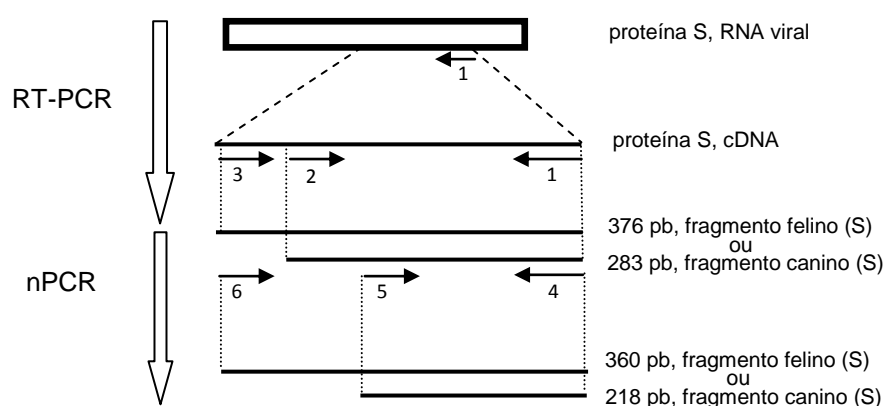


Tabela nº 5 – *Primers*, posição no genoma e tamanho do fragmento originado, utilizados no RT-PCR para subtipificação de FCoV. Adaptado de Addie et al., 2003.

Subtipo	Primer	Sequência (5'→3')	Posição no genoma	Fragmento
FCoV I	lubs	CCACACATACCAAGGCC	4280-4296	376 pb
	lffs	GTTTCAACCTAGAAAGCCTCAGAT	3921-3944	
	nlubs	CCAAGGCCATTTTACATA	4270-4287	360 pb
	nlffle	CCTAGAAAGCCTCAGATGAGTG	3928-3949	
FCoV II	lubs	CCACACATACCAAGGCC	4280-4296	283 pb
	lcfs	GCCTAGTATTATACCTGACTA	3978-3998	
	nlubs	CCAAGGCCATTTTACATA	4270-4287	218 pb
	nlcfs	CAGACCAAAGTGGACTGTAC	4041-4060	

Tabela nº 6 – Ciclos térmicos utilizados no protocolo RT-PCR para subtipificação de FCoV.

Passo	Transcrição Reversa	Desnaturação Inicial	Desnaturação	Annealing	Extensão	Extensão Final
RT-PCR	42°C/ 45 min	94°C/ 2 min	94°C/ 20 seg	47°C/ 45 seg 35 ciclos	68°C/ 45 seg	68°C/ 10 min
nPCR		94°C/ 2 min	94°C/ 20 seg	47°C/ 45 seg 35 ciclos	68°C/ 4 5 seg	68°C/ 10 min

A amplificação foi realizada com o *kit* MyTaq™ One-Step RT-PCR (Bioline) com 3 µl de *template* RNA e os *primers forward* lffs, lcfs na concentração de 10 pmol/µl e 15 pmol/µl de *primer reverse* lubs, num volume total de 20 µl; para o *nested* PCR utilizou-se o *kit* de PCR 5 Prime Master Mix num volume final de 20 µl, com 3 µl de *template* da reacção anterior, 2,75mM de MgCl<sub>2</sub> e os *primers forward* nlffles, nlcfs e *primer reverse* nlubs nas mesmas concentrações da primeira reacção.

Os produtos de amplificação foram analisados por electroforese horizontal em TBE (tampão *Tris/Borate/EDTA*), em gel de agarose a 2%, contendo Gel Red™ (Biotium) a 0,005% na presença do marcador de peso molecular HyperLadder™ II (Bioline).

## 2.7. Síntese de cDNA

A quantificação da expressão dos mediadores da resposta inflamatória foi realizada a partir do cDNA dos RNAs totais celulares das amostras de sangue. O cDNA foi sintetizado com o *kit* *Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis* (Roche Applied Science). Após *annealing* de 1 µg de RNA total com 5 µM de *primer* Oligo(dT)<sub>18</sub>, a 65°C durante 10 minutos, adicionou-se 1x tampão de reacção, 20 U de inibidor de RNase, 1 mM de dNTP e 10 U de transcriptase reversa, num volume final de 20 µl. A reacção foi incubada 30 minutos a 55°C para síntese de cDNA, seguida de 5 minutos a 85°C para inactivação da enzima, armazenando-se a – 20°C até utilização.

## 2.8. qPCR

Para quantificação da expressão do mRNA dos mediadores inflamatórios (IL-10, IL-4, IL-12p35, IFN-γ e TNF-α) o cDNA foi submetido a qPCR, utilizando *SYBR® Green*. Este processo é semelhante ao anteriormente descrito mas o sinal de fluorescência detectado pelo aparelho resulta da molécula fluorescente (*SYBR® Green*) que se intercala nas cadeias duplas de DNA, durante o processo de amplificação. Durante o passo de desnaturação do ciclo de amplificação, o *SYBR® Green* liberta-se e a fluorescência diminui drasticamente. No passo de extensão do PCR, com a formação do produto de cadeia dupla há nova ligação do

SYBR® Green, aumentando a intensidade de fluorescência que é proporcional à quantidade de produto que se gera e que irá ser detectada pelo aparelho no qual se está a realizar a amplificação (VanGuilder et al., 2008). A temperatura na qual 50% das moléculas de cadeia dupla de DNA se encontram desnaturadas ( $T_m$  - temperatura de *melting*) depende da dimensão da cadeia de DNA e da sequência específica dos nucleótidos que a compõem. Esta é específica da molécula em questão, formando um pico único na curva de *melting* gerada pelo aparelho, que nos indica e garante a presença da molécula específica do objectivo de estudo.

O aparelho utilizado foi o StepOne Plus™ da Applied Biosystems®. O volume final de reacção foi de 20 µl por reacção, utilizando igual concentração de *template* para o gene *housekeeping* (HK) e para cada citoquina, os *primers forward* e *reverse* específicos (Tabela nº 7) na concentração de 0,5 µM e 10 µl de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®, Portugal). Foi utilizado o protocolo de amplificação *standard* para o aparelho (Tabela nº 8).

Para cada animal, o mRNA de cada citoquina (IL-10, IL-4, IL-12p35, IFN-γ e TNF-α) foi analisado quantitativamente em comparação ao valor relativo do mRNA de um gene *housekeeping*, normalizando o nível de expressão. Neste trabalho o gene de referência escolhido foi o B2M (β2-microglobulina).

Tabela nº 7 – *Primers* utilizados na medição da expressão da transcrição de citoquinas e dimensão do fragmento amplificado.

Gene	Primer	Sequência (5'→3')	Produto de amplificação
IL-10	Forward	ACTTTCTTTCAAACCAAGGACGAG	131 pb <sup>a)</sup>
	Reverse	GGCATCACCTCCTCCAAATAAAAC	
IL-12p35	Forward	ACACCAAGCCCAGGAATGTTC	82 pb <sup>a)</sup>
	Reverse	TGGCCTTCTGAAGCGTGTTG	
IL-4	Forward	CCCCTAAGAACACAAGTGACAAG	100pb <sup>b)</sup>
	Reverse	CCTTTGAGGAATTTGGTGGAG	
IFN-γ	Forward	TGCAAGTAATCCAGATGTAGCAG	81 pb <sup>b)</sup>
	Reverse	GTTTTATCACTCTCCTCTTTCCAG	
TNF-α	Forward	CACATGGCCTGCAACTAATC	104 pb <sup>b)</sup>
	Reverse	AGCTTCGGGGTTTGCTACTAC	
B2M	Forward	CGCGTTTTGTGGTCTTGGT	84 pb <sup>c)</sup>
	Reverse	AAACCTGAACCTTTGGAGAATGC	

a) *Primers* referidos por Taglinger, Van Nguyen, Helps, Day e Foster, 2008;

b) *Primers* referidos por Kessler et al., 2009

c) *Primers* referidos por Scott et al., 2011

Tabela nº 8 – Ciclo térmico utilizado no protocolo qPCR com SYBR® Green.

	Desnaturação	Annealing	Extensão
qPCR	95°C/ 10 min	90°C/ 15 seg	60°C/ 1 min
		50 ciclos	

## 2.9. Quantificação relativa da transcrição das citoquinas

A quantificação relativa obtida através de qPCR foi inserida num *software* disponível *online* (<http://www.miner.ewindup.info/miner/index.htm>), Real Time PCR Miner 4.0, para análise e comparação quantitativa do mRNA transcrito. Este *software* funciona com base num logaritmo, utilizando um método objectivo e independente do equipamento utilizado na amplificação (Zhao & Fernald, 2005). Os resultados obtidos foram posteriormente inseridos numa folha de cálculo no *software* Microsoft Office Excel 2007 para obter o  $R_0$  (quantidade relativa de *template* na amostra original) utilizando a seguinte fórmula, na qual E representa a eficiência do gene na reacção de PCR e Ct o limiar da reacção (Zhao & Fernald, 2005):

$$R_0 = \frac{1}{(1 + E)^{Ct}}$$

O  $R_0$  foi calculado para o gene *housekeeping* em cada placa e para cada gene x. A normalização obteve-se pela divisão do  $R_0$  do gene x pelo  $R_0$  do gene *housekeeping*.

## 2.10. Análise estatística

A análise estatística dos dados obtidos ao longo de todo o trabalho foi efectuada no *software* Microsoft Office Excel 2007, no IBM SPSS Statistics 20 e alguns gráficos foram ainda construídos no R (Institute for Statistics and Mathematics, 2012).

Para avaliação da distribuição dos dados de cada variável foi aplicado o Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk. Nenhuma delas se apresentou com distribuição normal, sendo por tal transformados logaritmicamente. Após a transformação, a normalidade não foi conseguida pelo que foram utilizados testes não paramétricos na análise estatística.

Para comparação entre as médias de grupos independentes, “Carga Viral” e “Grupos I, II e III”, utilizou-se o equivalente não paramétrico da One Way ANOVA, o Teste de Kurskal Wallis. O mesmo teste foi aplicado para comparação entre as médias de cada citoquina estudada e os “Grupos I, II e III”. Com este teste é possível avaliar estatisticamente se há interacção entre as diferentes variáveis.

Para avaliar a existência de correlação dos níveis de expressão entre cada citoquina e ainda, a carga viral, foi aplicado o Teste de Spearman (Spearman’s Rank Correlation Coefficient), equivalente não paramétrico do Coeficiente de Correlação de Pearson. Com

este teste obtém-se uma medida da força de associação linear entre pares de variáveis. Caso se observem, pode-se ainda avaliar a existência de tendências apesar da inexistência de significância estatística. Apesar de até aqui o tratamento de dados ter sido feito respeitando os diferentes grupos clínicos, neste teste não foi considerado o grupo devido à dimensão reduzida da amostra total utilizada ( $n=15$ ) e cada grupo ser composto por 4 a 6 elementos. Assim os animais foram avaliados segundo a sua resposta individual imunitária à infecção pelo FCoV. Foi testada a hipótese nula de o coeficiente de correlação entre duas populações ser zero, sem associação linear entre as duas variáveis. Em todos os testes, o nível de significância utilizado foi  $p < 0,05$ .

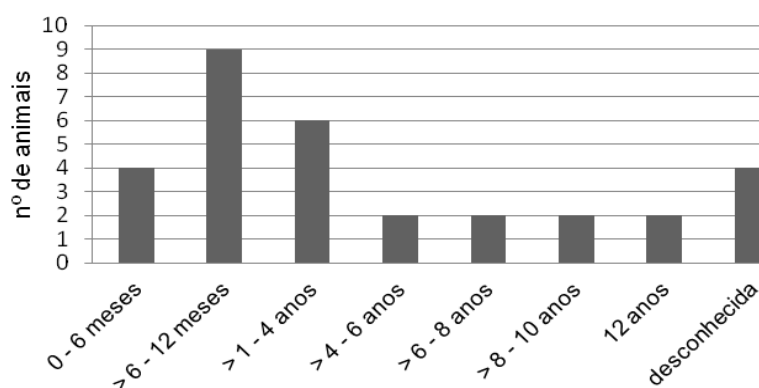


## IV. RESULTADOS

### 1. Caracterização da amostra

A amostra inicial em estudo caracterizou-se por 31 (N=31) indivíduos com idades compreendidas entre os 4 meses e os 12 anos, sendo o intervalo mais representado o dos 6-12 meses, com 9 animais (Gráfico nº 1). A proveniência da recolha das amostras biológicas dos 31 animais incluiu o Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (n=26), a Clínica Veterinária da Pontinha (n=2), o Hospital Veterinário de Sº Bento (n=1), o Consultório Veterinário João Alvadia (n=1) e o Centro Veterinário Quinta do Anjo (n=1). A informação relativa à raça dos animais foi considerada não relevante para os presentes objectivos.

Gráfico nº 1 – Frequência etária dos animais incluídos no estudo por intervalos etários (N=31).



No final do período de recolha das amostras biológicas, o número destas que chegou ao laboratório foi de 27 zaragatoas rectais e/ou fezes, 25 amostras de sangue total e 8 amostras de líquido de derrame (torácico/abdominal).

Os critérios de divisão em três grupos distintos, para além da avaliação clínica, incluíram a inclusão de animais com informação clínica e analítica o mais completa possível e de se ter conseguido realizar a quantificação do perfil imunitário em todos os animais, embora tendo como consequência em alguns grupos, uma redução no número de animais.

#### 1.1. Caracterização do Grupo I

Animais positivos a FCoV, cuja história clínica e análises complementares, quando existentes, não demonstraram suspeita de PIF (n=5). Dos 5 animais pertencentes ao grupo I (Tabela nº 9) 3 eram machos, 1 era fêmea e um de sexo desconhecido. As idades variaram entre 18 meses e 6 anos (média aproximada de 3 anos), desconhecendo-se esta informação em dois elementos.



### 1.2. Caracterização do Grupo II

Animais positivos a FCoV, cuja história clínica e análises complementares indicaram suspeita de PIF com sintomatologia gastrointestinal (n=4). Os 4 elementos pertencentes ao grupo II (Tabela nº 9) eram machos. As idades encontravam-se compreendidas entre os 8 meses e o ano e meio (média de 9 meses).

### 1.3. Caracterização do Grupo III

Animais positivos a FCoV, cuja história clínica e análises complementares indicaram suspeita de PIF com alterações predominantemente oculares e de SNC (n=6). Dos 6 animais pertencentes ao grupo III (Tabela nº 9), 3 eram machos e os restantes 3 fêmeas; as idades distribuíram-se entre os 6 meses e os 2 anos (média de 11 meses).

Tabela nº 9 – Distribuição da idade e género por animal em estudo (n=15).

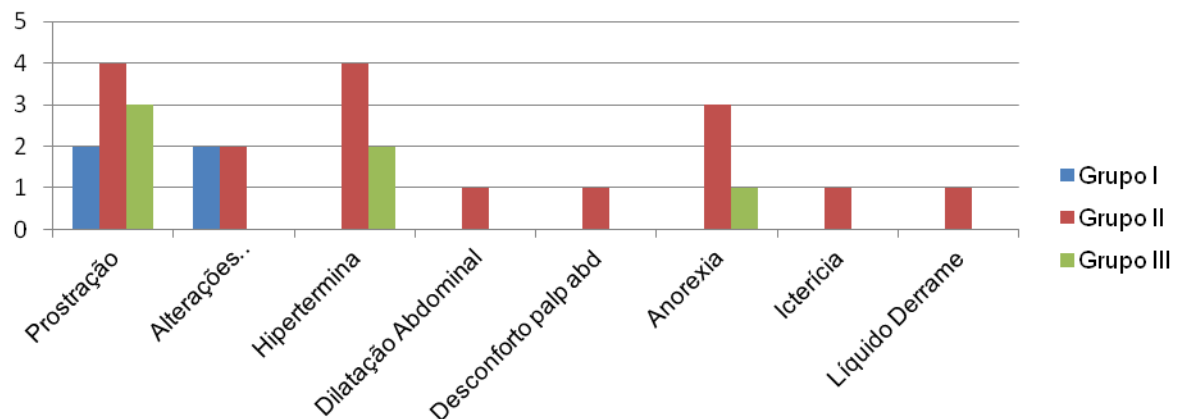
Animal*	Idade	Género
A	-	-
B	6 anos	M
C	2 anos	M
D	-	F
E	18 meses	M
F	18 meses	M
G	8 meses	M
H	1 ano	M
I	8 meses	M
J	6 meses	F
K	1 ano	F
L	2 anos	M
M	9 meses	M
N	6 meses	M
O	7 meses	F

\*Grupo I, de A a E; grupo II, de F a I e grupo III, de J a O. Legenda: M, macho; F, fêmea; “-”, informação desconhecida.

## 2. Análise clínica dos diferentes grupos

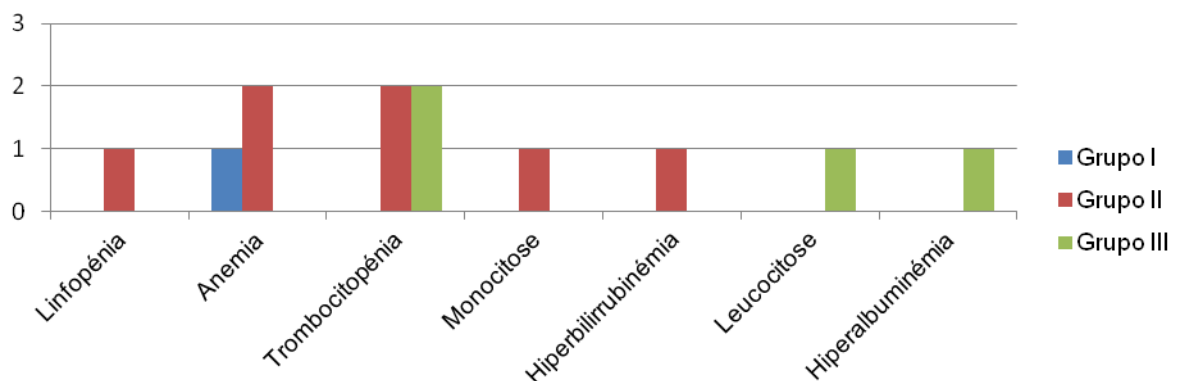
A divisão dos 15 animais nos grupos anteriormente apresentados foi feita com base em alterações clínicas observadas pelos veterinários responsáveis (prostração, alterações respiratórias, hipertermia, dilatação abdominal, desconforto à palpação abdominal, anorexia, icterícia e presença de líquido de derrame) (Gráfico nº 2).

Gráfico nº 2 – Alterações clínicas gerais observadas nos animais (n=15) que integram o estudo, divididos por grupos clínicos.



Nos mesmos grupos foram ainda observadas as alterações analíticas encontradas no hemograma e nas análises bioquímicas, tais como: linfopénia, anemia, trombocitopénia, monocitose, hiperbilirrubinémia, leucocitose e hiperalbuminémia (Gráfico nº 3).

Gráfico nº 3 – Alterações analíticas de hemograma e bioquímicas observadas nos animais (n=15) que integram o estudo, divididos por grupos clínicos.



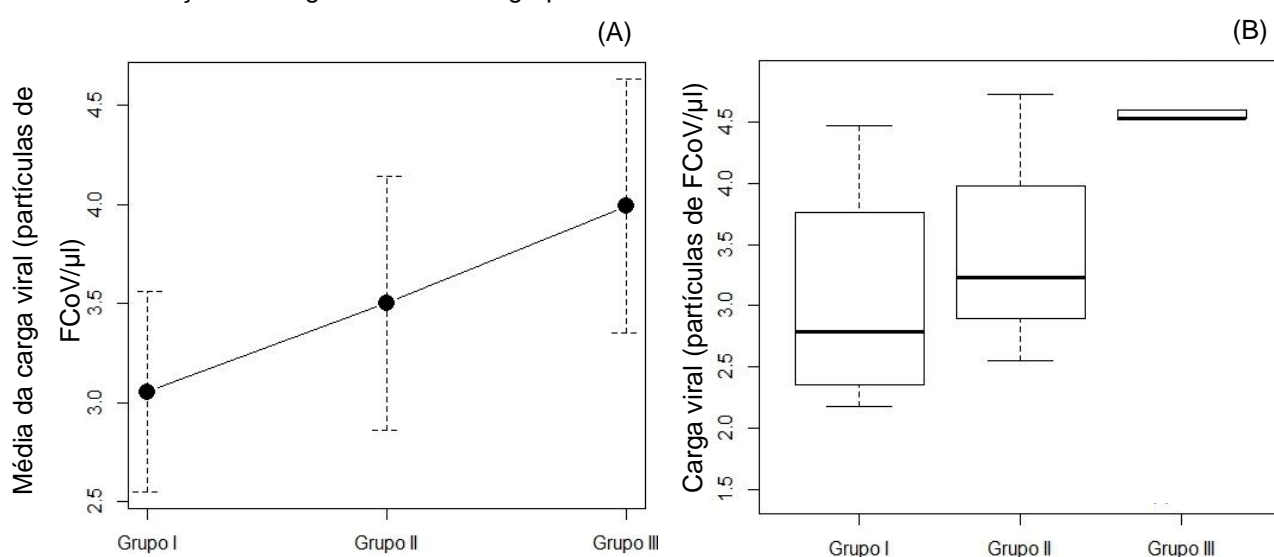
Os animais do grupo III apresentaram alterações de SNC, tais como: ataxia, desorientação, convulsões, vocalização anormal, descoordenação, *head tilt* e blefarospasmo. Alterações oftálmicas como uveíte, edema da córnea e glaucoma foram observadas em animais do mesmo grupo.

### 3. Quantificação viral de FCoV

Foram testadas 34 amostras biológicas (26 zaragatoas rectais e/ou fezes e 8 de líquido de derrame), para avaliação do nível de excreção viral dos animais, através da medição da carga viral por RTqPCR, tendo sido conseguida em 28 amostras (21 zaragatoas rectais e/ou fezes e 7 amostras de líquido de derrame). O valor médio obtido nas 21 zaragatoas rectais foi de  $10^{3,04}$  partículas de FCoV/ $\mu$ l e o valor médio obtido nas 7 amostras de líquido de derrame foi de  $10^{3,71}$  partículas de FCoV/ $\mu$ l. Nas restantes amostras a quantificação não foi considerada, devido ao nível de detecção do RNA viral ter sido muito baixo, fora do *cutoff* da reacção de RTqPCR.

Após o agrupamento dos animais ( $n=15$ ) em categorias clínicas (Grupos I, II e III), foi possível realizar a medição da carga viral, obtidas de zaragatoas rectais, em 12 deles. Neste caso, o valor mínimo registado foi de  $10^{1,44}$  partículas de FCoV/ $\mu$ l enquanto que o valor superior foi de  $10^{4,86}$  partículas de FCoV/ $\mu$ l com um valor médio de  $10^{3,47}$  partículas de FCoV/ $\mu$ l. Dentro de cada grupo clínico, a média da carga viral mais baixa foi a do grupo I com  $10^{3,06}$  partículas de FCoV/ $\mu$ l (desvio-padrão de  $10^{1,01}$  partículas de FCoV/ $\mu$ l), seguindo-se o grupo II com um valor médio de  $10^{3,50}$  partículas de FCoV/ $\mu$ l (desvio-padrão de  $10^{1,11}$  partículas de FCoV/ $\mu$ l) e por fim, a média mais alta de  $10^{3,99}$  partículas de FCoV/ $\mu$ l, foi registada no grupo III (desvio-padrão de  $10^{1,43}$  partículas de FCoV/ $\mu$ l) (Gráfico nº 4). Não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre as médias da carga viral de cada grupo clínico.

Gráfico nº 4 – Distribuição descritiva da medição da carga viral das amostras biológicas ( $n=15$ ) por grupo clínico (I, Portadores; II, Gastrointestinal; III, Ocular/SNC). (A) Gráfico de médias para observação de diferenças entre as médias de cada grupo clínico. (B) Gráficos caixa-de-bigodes com a distribuição da carga viral em cada grupo clínico.



#### 4. Subtipificação das amostras rectais e de líquido de derrame

Os mesmos materiais biológicos utilizados para medição da carga viral foram também subtipificados, adicionando-se ao estudo mais uma zaragatoa rectal de uma nova análise positiva, num total de 35 amostras biológicas, das quais 27 zaragatoas rectais e/ou fezes e 8 de líquido de derrame. Em 51% (18/35) das amostras foi identificado o FCoV do tipo I, em 6% (2/35) o FCoV do tipo II e em 3% (1/35) foi identificada a presença simultânea de FCoV tipo I e tipo II (co-infecção). Em 40% (14/35) não se obtiveram resultados conclusivos (Gráfico nº 5, Tabela nº 10, Figura nº 5).

Figura nº 5 (à direita) – Produtos da subtipificação por RT-PCR, mostrando a amplificação de 6 amostras biológicas em gel de agarose a 2% (poços 1 a 6 – produtos de amplificação do RT-PCR, poço 7 - controlo negativo). Poços 1, 3, 4 e 5, com banda com peso molecular de 360 pb correspondendo ao tipo I; poço 4, com duas bandas de amplificação (360bp tipo I; 218 pb, tipo II (co-infecção)); poços 2 e 6 sem amplificação. Marcador de peso molecular (HyperLadder™ II, Bioline) de 50 pb a 2000pb.

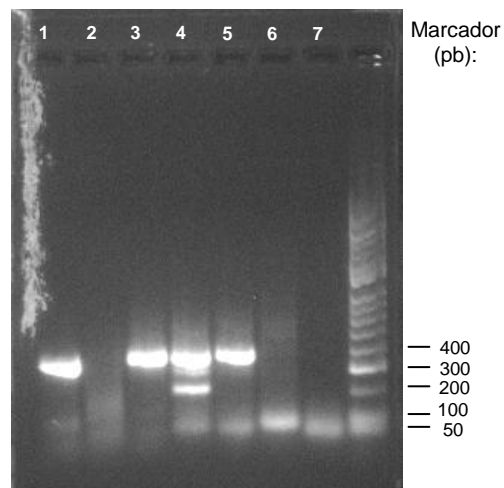
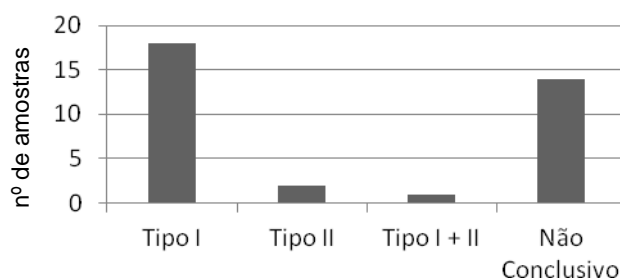


Tabela nº 10 – Distribuição dos resultados da subtipificação viral em função do material biológico testado (zaragatoas rectais/fezes e líquido de derrame) (n=35).

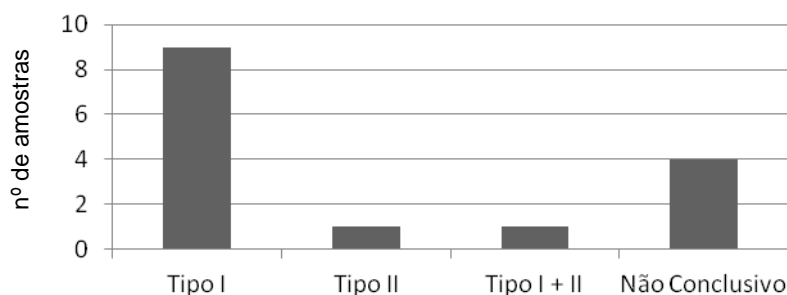
Material biológico	Tipo I	Tipo II	Tipo I + II	Não conclusivo	Total (amostras)
Zaragatoa rectal/fezes	14	2	1	10	27
Líquido de derrame	4	0	0	4	8
<b>Total (resultados)</b>	<b>18 (51%)</b>	<b>2 (6%)</b>	<b>1 (3%)</b>	<b>14(40%)</b>	<b>35</b>

Gráfico nº 5 – Frequência dos resultados da subtipificação viral das amostras rectais e/ou fezes e de líquido de derrame da amostra inicial (n= 35). Resultado de 51% (18/35) do tipo I, 6% (2/35) do tipo II e 40% (14/35) sem resultado conclusivo. Uma amostra (3%) apresentou simultaneamente os tipos I e II (co-infecção).



Após divisão por grupos clínicos (n=15) em 60% (9/15) foi detectado FCoV do tipo I, em 6,5% (1/15) FCoV tipo II, em 6,5% (1/15) co-infecção com detecção simultânea de FCoV do tipo I e II e em 27% (4/15) das amostras não se obteve um resultado conclusivo (Gráfico nº 6). Os materiais biológicos correspondentes ao total das 15 amostras foram exclusivamente zaragatoas rectais e/ou fezes.

Gráfico nº 6 – Subtipificação após divisão por grupos clínicos (n= 15). Resultado de 60% (9/15) do tipo I, 6,5 % (1/15) do tipo II, 6,5% (1/15) do tipo I e II simultaneamente e 27% (4/15) sem resultado conclusivo.

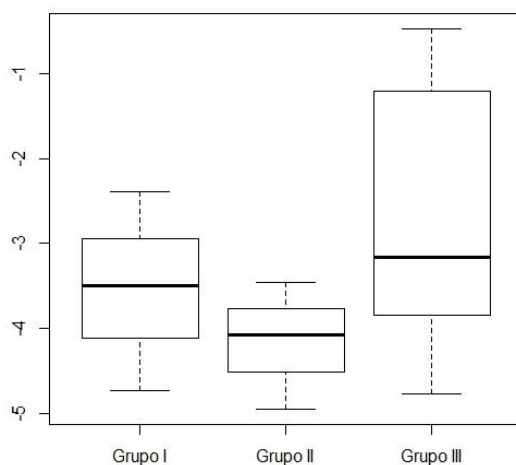


## 5. Quantificação relativa de IL-10, IL-4, IL-12p35, IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ nos grupos I, II e III

### 5.1. Comparação da quantificação relativa da IL-10 nos grupos clínicos I, II e III

Verificou-se que os valores de expressão do mRNA da citocina IL-10 variaram entre os grupos clínicos (Gráfico nº 7). No grupo II a IL-10 apresentou-se com menor expressão do que nos outros, sendo aproximadamente 0,5 vezes menos expressa do que no grupo I e uma vez menos expressa do que no grupo III.

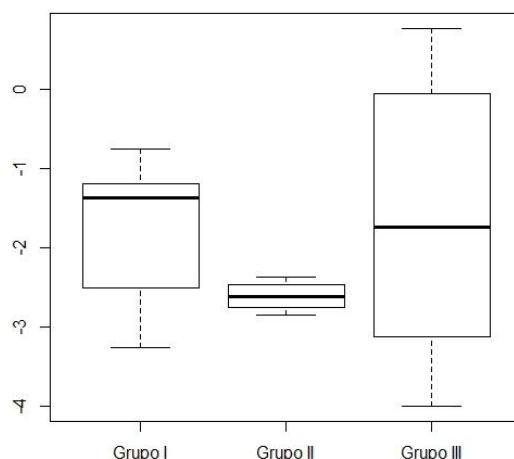
Gráfico nº 7 – Distribuição dos resultados da quantificação relativa do mRNA da citocina IL-10 nos diferentes grupos clínicos.



### 5.2. Comparação da quantificação relativa da IL-4 nos grupos clínicos I, II e III

Os valores da expressão do mRNA da citocina IL-4 (Gráfico nº 8) apresentou-se cerca de 0,5 vezes menos expressa no grupo III em relação ao grupo I, enquanto que no grupo II apresentou-se aproximadamente 1 vez menos expressa do que no grupo dos portadores (I).

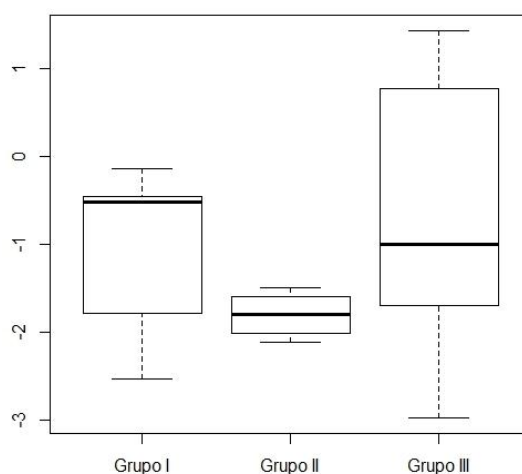
Gráfico nº 8 – Distribuição dos resultados da quantificação relativa do mRNA da citocina IL-4 nos diferentes grupos clínicos.



### 5.3. Comparação da quantificação relativa da IL-12p35 nos grupos clínicos I, II e III

No grupo I observaram-se os valores de expressão de mRNA mais elevados da transcrição da citocina. A expressão do mRNA da IL-12p35 (Gráfico nº 9) no grupo III apresentou-se cerca de 0,5 vezes menos expressa do que no grupo I; no grupo II apresentou-se cerca de 1,5 vezes menos expressa do que no grupo I.

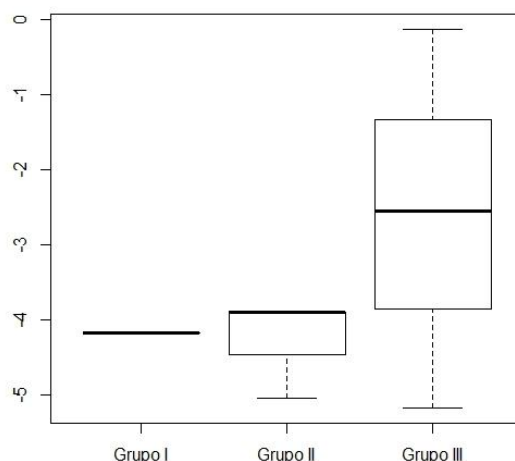
Gráfico nº 9 – Distribuição dos resultados da quantificação relativa do mRNA da citocina IL-12p35 nos diferentes grupos clínicos.



#### 5.4. Comparação da quantificação relativa do IFN- $\gamma$ nos grupos clínicos I, II e III

Os valores de expressão do mRNA da citocina IFN- $\gamma$  exibiram algumas diferenças entre os grupos clínicos (Gráfico nº 10). No grupo III observou-se o valor de expressão relativa mais elevada do IFN- $\gamma$ , sendo cerca de 1,5 vezes superior ao dos grupos I e II.

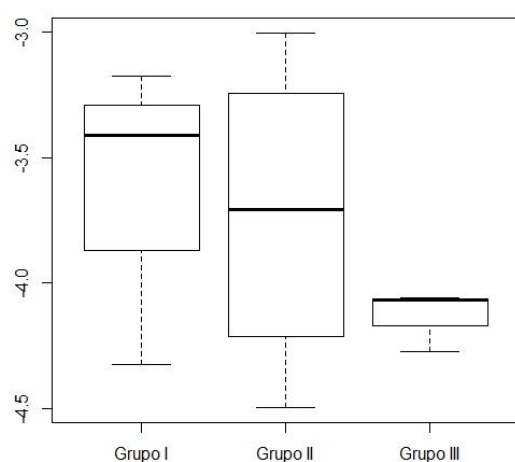
Gráfico nº 10 – Distribuição dos resultados da quantificação relativa do mRNA da citocina IFN- $\gamma$  nos diferentes grupos clínicos.



#### 5.5. Comparação da quantificação relativa do TNF- $\alpha$ nos grupos clínicos I, II e III

Em relação aos valores de expressão do mRNA da citocina TNF- $\alpha$  (Gráfico nº 11), no grupo I a transcrição foi, aproximadamente, 0,7 vezes superior à do grupo II e cerca de 1,5 vezes superior à do grupo III.

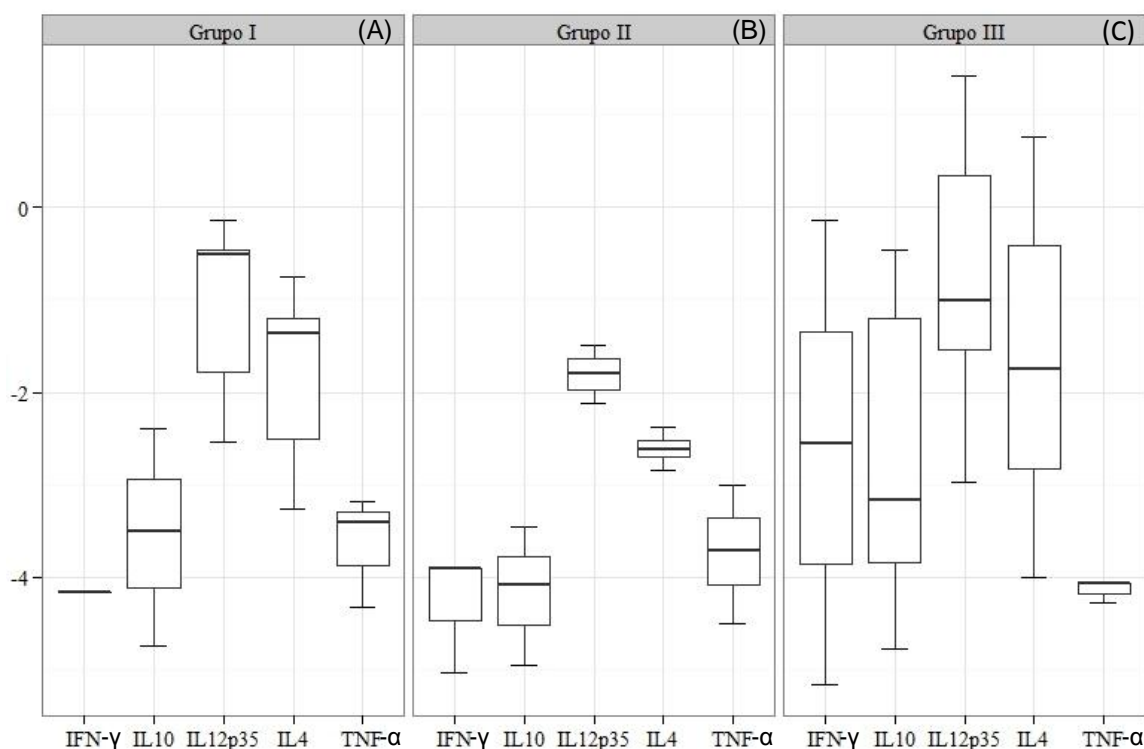
Gráfico nº 11 – Distribuição dos resultados da quantificação relativa do mRNA da citocina TNF- $\alpha$  nos diferentes grupos clínicos.



## 6. Resultados da comparação da medição de citocinas dos grupos I, II e III

Embora com algumas variações (Gráfico nº 12) não foram detectadas diferenças significativas entre as médias das observações das citocinas em relação ao grupo em que se inseriam com resultados superiores, para todas as citocinas, ao nível de significância considerado ( $p < 0,05$ ).

Gráfico nº 12 – Gráficos caixa-de-bigodes dos níveis de expressão das citocinas IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-12p35, TNF- $\alpha$  e IL-4 em cada grupo. Pela sua observação identificam-se aparentes diferenças na medição dos níveis das citocinas transcritas. Pode-se observar que a citocina com maior expressão é a IL-12p35. (A) Níveis de expressão da transcrição das 5 citocinas no grupo I. Não foi possível construir o gráfico correspondente ao IFN- $\gamma$  por só existir um valor obtido. (B) Níveis de expressão da transcrição das 5 citocinas no grupo II. (C) Níveis de expressão da transcrição das 5 citocinas no grupo III.

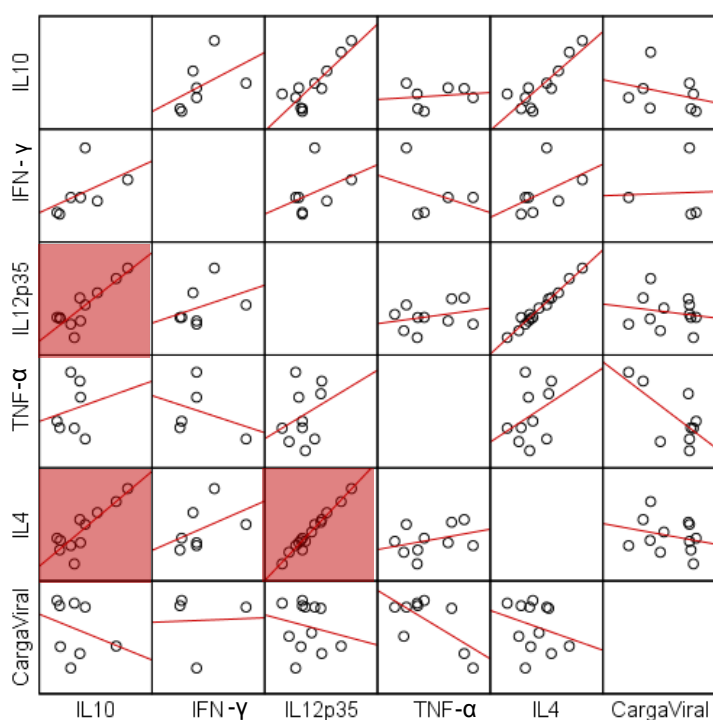




## 7. Resultados da correlação entre citocinas e entre cada citocina e carga viral

Foi detectada correlação entre os níveis de expressão das citocinas IL-4 e IL-10 ( $r=0,727$ ;  $p=0,011$ ), IL-4 e IL-12p35 ( $r=0,964$ ;  $p=0,000$ ) e IL-10 e IL-12p35 ( $r=0,655$ ;  $p=0,029$ ). Nestes pares de variáveis onde se observou correlação o valor de  $r$  tendeu para +1, significando que variavam no mesmo sentido (Gráfico nº 13).

Gráfico nº 13 – Matriz de correlação dos níveis de expressão entre as citocinas IL-10, IL-4, IL-12p35, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e entre cada citocina referida e a carga viral, no qual as rectas representam a relação entre os pares de variáveis. Legenda: quadrados vermelhos – a hipótese nula foi rejeitada, há correlação estatística entre as duas variáveis.



## **V. DISCUSSÃO**

### **1. Análise clínica e analítica dos grupos**

As amostras biológicas utilizadas neste estudo tiveram como objectivo primário a detecção molecular de coronavírus felino. Com base na informação clínica de cada caso, elaborada pelo médico veterinário responsável, os animais foram agrupados em três grupos clínicos, nomeadamente, portadores assintomáticos (grupo I), portadores com sintomatologia gastrointestinal suspeita de PIF (grupo II) e portadores com sintomatologia SNC e ocular suspeita de PIF (grupo III).

O grupo que apresentou mais alterações clínicas gerais foi o grupo II (gráfico nº 3). Neste, apenas num animal se identificou líquido de derrame abdominal, distensão abdominal e dor à palpação abdominal (animal H, Tabela nº 9). A melhor forma de detectar a presença de líquido de derrame, mesmo que se encontre em volume reduzido, é através de exploração ecográfica abdominal realizada em todos os animais, um exame não invasivo e sensível (Lewis & O'Brien, 2010). A forma húmida é a mais comum da doença, caracterizada pela presença de exsudado na cavidade abdominal (Pedersen, 2009a) e este animal pertencia ao grupo II, cuja descrição se aproxima mais da forma húmida da PIF, por oposição ao grupo III cujas características comuns são a presença de sintomatologia neurológica e ocular típica da outra forma da doença, a forma seca. Também pertencente ao grupo II, o animal F apresentou hiperbilirrubinemia sem icterícia, achado comum em gatos com PIF, especialmente na forma efusiva (Pedersen, 2009a). Já o animal G exibiu icterícia no exame clínico e não se conhece a informação sobre a medição da bilirrubina. Segundo Pedersen (2009a), a PIF é a causa mais comum de icterícia em gatos com idade inferior a 3 anos. Nesta doença, o nível aumentado de bilirrubina no sangue geralmente não tem causa hepática e ocorre devido a microhemorragias nos tecidos e por destruição extravascular de hemácias, secundária a vasculite e CID, pelas células fagocíticas (Pedersen, 2009a).

Todos os animais do grupo II apresentaram-se prostrados, sinal clínico inespecífico, tal como o parâmetro “anorexia”, que se verificou em três indivíduos (animais G, H e I). Todos os animais do mesmo grupo apresentaram-se com hipertermia, um dos primeiros sinais a surgir em casos de PIF, geralmente caracterizado por uma febre crónica não responsiva a antibióticos (Pedersen, 2009a).

A leucocitose neutrofílica e a linfopenia, a par de anemia não regenerativa, são alterações hematológicas bem reconhecidas em animais com PIF (Pedersen, 2009a). Observou-se anemia em dois animais (animais G e H) mas não foi possível aferir sobre a sua regenerabilidade. A linfopenia foi apenas observada num animal no grupo II (animal H),

traduzindo imunossupressão que é frequentemente associada à PIF (Pedersen, 2009a). A trombocitopenia foi identificada em dois animais do grupo II (animais F e H). Este é um achado comum em gatos e pode ser causado por redução da produção de plaquetas, aumento da sua utilização e/ou por aumento da sua destruição (Kohn, Linden & Leibold, 2006). Caso seja imunomediada, esta destruição ocorre por ligação de anticorpos à superfície da plaqueta com consequente destruição pelos macrófagos (Wondratschek, Weingart & Kohn, 2010), podendo a sua causa primária ser uma infecção viral como a PIF (Kohn et al., 2006; Wondratschek et al., 2010). Nesta doença também o aumento da reactividade das plaquetas, a necrose hepática difusa e a presença de lesões endoteliais, levando a CID, podem ser origem da trombocitopenia (Petersen, Couto & Wellman, 1995). As alterações referidas, não sendo específicas da PIF, podem ser encontradas em animais com doenças crónicas e em outras infecções virais, tais como FIV e FeLV. No entanto, todos os animais pertencentes aos grupos II foram testados para FIV e FeLV com resultados negativos para ambos os vírus.

As alterações clínicas observadas no grupo III eram maioritariamente oftálmicas e de SNC. A hiperalbuminemia foi encontrada num elemento desse grupo (animal M). Apesar de ser comum identificar, numa doença crónica como a PIF, anemia moderada não regenerativa e hipoalbuminemia (Pedersen, 2009a), Egberink et al. (1995) afirmaram que a hiperalbuminemia também pode ser um achado frequente.

## **2. Quantificação viral de FCoV em zaragatoas rectais/fezes e em líquido de derrame**

A identificação do vírus nas fezes ou em zaragatoas rectais permite a identificação de animais que são excretadores no momento da colheita da amostra. Sabe-se que os gatos começam a excretar o vírus, através das fezes, até uma semana após a infecção pelo FCoV (Pedersen et al., 2008), podendo começar tão cedo como 2 a 3 dias depois da infecção (Meli et al., 2004).

A presença do vírus no líquido de derrame pode ser explicada pela existência de lesões abdominais piogranulomatosas, típicas da forma húmida da doença, formadas por macrófagos onde ocorre a replicação do agente e que contêm o antígeno viral em altas concentrações (Pedersen, 2009a).

Partindo das 34 amostras iniciais, em 28 foi determinada a carga viral e nas restantes 6 (5 zaragatoas rectais/fezes e 1 amostra de líquido de derrame) o RNA do FCoV não foi quantificado. Nestas amostras não houve quantificação viral porque as respectivas curvas

de amplificação surgiram fora do Ct de quantificação ou seja, as curvas de amplificação revelaram-se muito tardias o que indica excreção viral em baixa quantidade.

O conjunto de 28 amostras nas quais se determinou a carga viral era composto por 21 zaragatoas rectais/fezes e 7 amostras de líquido de derrame. A média da carga viral no líquido de derrame ( $10^{3,71}$  partículas de FCoV/ $\mu$ l) foi superior à média obtida a partir das zaragatoas rectais/fezes ( $10^{3,04}$  partículas de FCoV/ $\mu$ l). A análise do líquido de derrame tem maior valor diagnóstico que a mesma análise realizada noutros tecidos (Hartmann et al., 2003). A presença de RNA viral na ascite aumenta a probabilidade do diagnóstico de PIF (Egberink et al., 1995) confirmando, assim, o diagnóstico de PIF nas 7 amostras de fluído de derrame.

Após a divisão dos 15 indivíduos por grupos clínicos, não houve medição da carga viral em apenas três amostras.

Apesar de aparentemente distintas (Gráfico nº 4A), as diferenças entre as médias da carga viral em cada grupo revelaram-se não significativas. Os valores obtidos nos grupos I e II parecem ter amplitudes de variação semelhantes (Gráfico nº 4B) e o grupo III registou menor variação de valores obtidos e, ainda, valor médio mais elevado. Ou seja, os valores registados no grupo de animais positivos a FCoV com sintomatologia ocular e de SNC parecem ser mais consistentes do que os observados nos outros dois grupos. Segundo Kipar e colegas (2006a), quando a carga viral é superior está em curso uma maior taxa de replicação viral ou os animais têm capacidade diminuída para eliminar a infecção viral. Com as informações disponíveis sobre o estatuto analítico dos animais do grupo III (Gráfico nº 3), não parece estar em curso uma diminuída capacidade de eliminação viral, podendo a sua média de carga viral mais elevada indicar uma taxa de replicação superior em relação aos outros grupos (Gráfico nº 4A).

Kipar et al. (2006a) observaram valores de carga viral inferiores em gatos saudáveis e infectados pelo FCoV quando comparados com gatos com PIF. Neste trabalho, também as médias da carga viral em gatos infectados com FCoV e assintomáticos foram inferiores relativamente às médias obtidas nos grupos com sintomatologia suspeita de PIF (Gráfico nº 4). No entanto, em animais infectados com FCoV e assintomáticos foi demonstrada a presença de infecção sistémica com cargas virais altas (Meli et al., 2004).

Apesar de não se terem observado diferenças significativas entre as cargas virais nos diferentes grupos, este achado não é totalmente anormal visto que ainda não foi descrita uma associação definitiva entre o nível de carga viral e o desenvolver da doença.

A medição da carga viral detecta directamente a presença de vírus (Hartmann et al., 2003) e pode ser realizada em diversos tecidos, oferecendo diferentes informações diagnósticas.

Neste caso, concluímos que todos os animais pertencentes aos três grupos eram excretores.

Já que se correlaciona com a excreção viral (Addie & Jarret, 2001), teria sido interessante determinar a titulação de anticorpos séricos nestes animais, para verificarmos se os animais com carga viral mais alta (grupo III) também exibiam títulos de anticorpos mais elevados. Apesar de o título de anticorpos não ter valor diagnóstico por si só, valores elevados de anticorpos aumentam a probabilidade do desenvolvimento da doença (Hartmann et al., 2003).

Surge a questão de a carga viral se relacionar com o tipo de padrão imunitário nos animais infectados e, no caso específico deste trabalho, se existe variação entre os grupos. Ao observarem uma carga viral inferior em gatos saudáveis, infectados pelo FCoV, quando comparados com gatos com PIF, Kipar et al. (2006a) sugeriram que a IL-10 pudesse ter influência por estimulação das células NK. Os mesmos autores sugeriram que, por outro lado, os valores mais elevados da carga viral na PIF pudessem ser devido à incapacidade do sistema imune em a reduzir ou eliminar por falta da IL-12.

### **3. Subtipificação do FCoV em zaragoas rectais/fezes e de líquido de derrame**

A prevalência dos subtipos do coronavírus felino tem sido pesquisada em diferentes regiões, com distribuição mundial. É aceite que o tipo I é o predominante, causando 80% a 90% das infecções (Le Poder, 2011, Kummrow et al., 2005, Hornyák et al., 2012).

Concordante com os trabalhos publicados, neste estudo o tipo I apresentou maior prevalência (51%) em relação ao tipo II (6%) (Gráfico nº 5), embora com menor prevalência do que a detectada em países como Reino Unido, Malásia, Taiwan, Áustria, Suíça com valores rondando os 97 e os 83% (Addie et al., 2003; Amer et al., 2012; Lin et al., 2009b; Benetka et al., 2004; Kummrow et al., 2005). Também num estudo realizado em território nacional (Duarte et al., 2009) a prevalência do tipo I foi consideravelmente superior ao obtido (79%).

O tipo II, resultado de uma recombinação entre o tipo I felino e o coronavírus canino, esteve envolvido em apenas 6% dos casos, uma frequência mais aproximada dos valores observados em outros países como, por exemplo, no Japão (10,8%) (Soma et al., 2013). Há um especial interesse em gatos onde se verifique co-infecção com os tipos I e II, que no presente trabalho foi detectada em 3% das amostras (animal J). A partilha do mesmo espaço físico entre cães e gatos, que é relativamente comum, poderia ser objecto de estudo para verificação da excreção viral do coronavírus em ambas as espécies, confirmando o Género e o subtipo do coronavírus e a infecção em espécies distintas. Na Áustria (Benetka

et al., 2004), Japão e Taiwan (Lin et al., 2009b), foram relatadas percentagens de co-infecção de 7%, 14,3% e 5,4%, respectivamente. No trabalho realizado por Mota em 2010 os resultados obtidos em Lisboa foram consideravelmente mais elevados, com 47,2% das amostras testadas a serem identificadas com co-infecção.

Considerando que os presentes resultados obtidos para o tipo II estão de acordo com o existente na literatura, poder-se-ia supor que a baixa prevalência do tipo I se justifica pela elevada percentagem de resultados não conclusivos (40%), que possivelmente enviesou os resultados. Estes resultados podem dever-se à alta taxa de recombinação associada ao gene S, o alvo amplificado na subtipificação, diminuindo a eficácia dos *primers* utilizados. Pode também ter ocorrido degradação do RNA entre o período da primeira análise da amostra e o período de subtipificação viral, ou ainda uma falha na transcrição reversa de RNA para DNA.

Quando da divisão da amostra em grupos clínicos, que resultou na diminuição de 35 para 15 amostras, a distribuição de prevalências sofreu alterações. Assim, em 60% das zaragatoas rectais/fezes foi detectado o FCoV do tipo I, em 6,5% foi detectado o tipo II e 6,5% corresponderam à co-infecção. Por fim em 27% das amostras não se obteve um resultado conclusivo (Gráfico nº 6). Este rearranjo evidencia uma prevalência superior do tipo I, aproximando-se do obtido anteriormente por Duarte et al. (2009).

#### **4. Quantificação relativa de IL-10, IL-4, IL-12p35, IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ nos grupos I, II e III**

Segundo Gelain et al. (2006), a caracterização do perfil de citocinas no sangue periférico fornece informações sobre o estado imune do animal, tanto em condições fisiológicas como patológicas.

Os estudos publicados sobre perfis de citocinas têm resultados controversos (Dean et al., 2003; Kiss et al., 2004) e existe pouca informação em gatos assintomáticos, naturalmente infectados com o FCoV (Gelain et al., 2006).

A maioria dos estudos tem sido realizada a partir de tecidos ou culturas celulares, tais como os PBMCs. Gelain et al. (2006) sugerem o uso de sangue total como método alternativo para avaliar os perfis de citocinas, obtendo dados que reflectem acontecimentos *in vivo* com maior precisão. Esta foi a abordagem utilizada neste trabalho, com um grupo de controlo composto por gatos naturalmente infectados pelo FCoV e aparentemente saudáveis (I). A ele foram comparados dois grupos nos quais todos os animais eram naturalmente infectados pelo FCoV, um deles com sintomatologia gastrointestinal suspeita de PIF (II) e outro com sintomatologia ocular e de SNC suspeitas de PIF (III).

#### **4.1. Comparação da quantificação relativa da IL-10 nos grupos clínicos I, II e III**

Apesar de não haver diferenças significativas entre as médias dos níveis de transcrição da citocina IL-10 nos grupos I, II e III, a média da transcrição do mRNA de IL-10 no grupo de infectados com FCoV e com sintomatologia gastrointestinal (II), apresentou-se aproximadamente 0,5 vezes menos expressa do que nos grupos dos portadores (I) e uma vez menos expressa do que nos positivos a FCoV com sintomatologia de SNC e ocular (III) (Gráfico nº 7). Confirmou-se um nível de expressão mais elevada no grupo dos indivíduos infectados com FCoV e assintomáticos (Dean et al., 2003; Kipar et al., 2006b), o que revela o papel protector da citocina durante a infecção. Esta controla a reacção excessiva da resposta inflamatória por inibição de linfócitos T e macrófagos activados, de outras citocinas (IL-12, TNF, IL-1 $\beta$ ) e ainda da resposta celular, o que vai resultar numa limitação da resposta imune específica apesar da estimulação antigénica persistente no decorrer de virémia prolongada (Meli et al., 2004). Também a comparação do nível de transcrição da citocina no grupo com sintomatologia gastrointestinal está de acordo com o verificado por Foley et al. (2003) e Kipar et al. (2006b) em animais com PIF generalizada, os quais, aparentemente estão a montar uma resposta humoral ineficaz. É de salientar que no presente trabalho, todas as medições foram realizadas em RNA celular de amostras de sangue total, diferindo do estudo de Foley et al. (2003), cujo tecido utilizado foi o cérebro, e dos realizados em tecidos linfóides (Dean et al., 2003; Kipar et al., 2006b). Os diferentes tecidos exibem diferentes medições de citocinas (Gelain et al., 2006). Ainda assim, os resultados obtidos no grupo III levantam dúvidas por o nível de expressão ter um valor muito semelhante, até ligeiramente superior, ao dos animais saudáveis. A justificação poderá ir ao encontro do reportado por Foley et al. (2003), que registou valores mais elevados de IL-10 no grupo com PIF neurológica, embora tenha sido medida no cérebro. Os animais deste grupo também exibiram poucas alterações clínicas gerais, demonstrando que, neste caso, as lesões de PIF podem estar confinadas no SNC, explicando os resultados semelhantes aos animais saudáveis.

A medição da IL-6 poderia auxiliar a explicação dos resultados obtidos, já que a produção desta citocina é inibida pela IL-10. Takano et al. (2009a) verificou níveis superiores de IL-6 em gatos com PIF e níveis inferiores em gatos SPF, o que pode também explicar níveis inferiores de IL-10 em gatos com PIF e níveis superiores em gatos aparentemente saudáveis, respectivamente.

#### **4.2. Comparação da quantificação relativa da IL-4 nos grupos clínicos I, II e III**

Os resultados dos níveis de transcrição da IL-4 não exibiram diferenças entre os grupos após análise estatística. Dean et al., em 2003, verificaram baixos níveis na transcrição do mRNA de IL-4 nos tecidos linfóides de gatos infectados com o FIPV, comparando com a transcrição em tecidos não infectados pelo FIPV. No presente estudo (Gráfico nº 8), os animais aparentemente saudáveis, infectados com FCoV (I), apresentaram níveis de transcrição de IL-4 superiores quando comparados com gatos infectados com FCoV e com sintomatologia gastrointestinal (II) e ainda com os gatos infectados com FCoV com sintomatologia de SNC e ocular (III). Ainda, os gatos infectados com FCoV e com sintomatologia gastrointestinal, apresentaram níveis de transcrição do mRNA desta citocina inferiores ao último grupo.

A produção prematura de IL-4 promove a diferenciação de células que vão participar na resposta imunitária humoral ( $T_H2$ ) (Male, Brostoff, Roth, & Roitt, 2006). Ao reprimir o sinal da IL-12 (Lazarski, Ford, Katzman, Rosenberg & Fowell, 2013), a IL-4 antagoniza os efeitos da activação dos macrófagos pelo IFN- $\gamma$  (aumento da secreção de IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ ) (Tizard, 2006) e, assim, inibe as reacções da resposta imunitária celular ( $T_H1$ ) (Abbas & Lichtman, 2005). Por sua vez, o IFN- $\gamma$  neutraliza as acções desta interleucina.

O baixo nível da citocina no grupo com sintomatologia gastrointestinal (II) pode explicar-se por uma dificuldade na montagem da resposta humoral, não havendo estimulação do crescimento e diferenciação das células B quando comparado com os outros grupos, o que é comum na patogénese da PIF. Aparentemente, em nenhum dos grupos o nível de IFN- $\gamma$  é superior ao da interleucina-4 (Gráfico nº12A, B e C), podendo não ser suficiente para antagonizar os seus efeitos. Ou, mais simplesmente, estes resultados mostram apenas que existe alguma resposta humoral a decorrer em todos os grupos, com maior expressão no I e III, contrariamente ao verificado no caso da expressão da IL-10. Dean et al. (2003) afirmaram que o baixo nível de transcrição da IL-4 nos tecidos infectados é mais consistente com um perfil de citocina misto, ou seja  $T_H1$  e  $T_H2$ .



#### **4.3. Comparação da quantificação relativa da IL-12p35 nos grupos clínicos I, II e III**

O resultado da transcrição do mRNA de IL-12p35 aparentemente exhibe diferenças entre os três grupos (Gráfico nº 9) o que se revelou sem significado quando analisado estatisticamente. Ainda assim, comparativamente com o grupo dos infectados assintomáticos (I) e com os infectados com sintomatologia de SNC e ocular (III), o grupo com sintomatologia gastrointestinal (II) demonstrou os níveis de transcrição mais baixos desta citocina. O grupo de infectados e assintomáticos expressou-se num nível superior do que os outros dois grupos, tal como Kipar et al. (2006b) e Dean et al. (2003) observaram comparando gatos SPF e FCoV positivos com gatos com PIF. Ou seja, os gatos doentes apresentaram níveis inferiores da citocina que no presente trabalho apenas não está em concordância com o observado no grupo III. Foi especulado (Foley et al., 2001) que as citocinas na PIF neurológica expressam-se em níveis mais elevados do que na PIF generalizada, podendo ser o caso, também observado na transcrição da IL-10 e IL-4.

A citocina IL-12 é heterodimérica composta por duas subunidades, a p35 e a p40. A subunidade p40 é homóloga a receptores de citocinas enquanto que a subunidade p35 é semelhante à IL-6 e G-CSF e não é secretada na forma homodimérica, ao contrário da p40. A subunidade p35 é expressa constitutivamente (Watford, Morigushi, Morinobu & O'Shea, 2003).

A IL-12 é um dos principais intervenientes na resposta inata prematura (Abbas & Lichtman, 2005). A sua função mais importante é a estimulação da produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos T e células NK. Por sua vez, o IFN- $\gamma$  estimula a produção da IL-12 (Abbas & Lichtman, 2005). Como efeito secundário, esta citocina suprime a produção de IgE por supressão da síntese de IL-4 (Tizard, 2006). É ainda inibida pela IL-10 (Abbas & Lichtman, 2005). Os estudos têm sido efectuados com a medição da transcrição do mRNA de IL-12p40 mas no presente estudo foi utilizada a IL-12p35. Como não existem publicações em que tenha sido utilizada esta forma, a comparação foi feita com a forma IL-12p40.

Possivelmente a resposta celular é menos activa no grupo II, comparativamente aos grupos I e III. Kipar et al. (2006b) postularam que gatos infectados com FCoV que não desenvolvem PIF conseguem montar uma resposta imune eficaz específica para o FCoV e conseguem evitar a excessiva activação de macrófagos, possivelmente devido à sobre regulação da produção de IL-10. Complementarmente, o desenvolvimento de PIF, pode ser devido à falta de IL-12 que impede uma resposta imunitária celular efectiva e permite a activação dos monócitos e macrófagos e o derradeiro desenvolvimento da doença.

Como referido anteriormente, Kipar et al. (2006a) sugerem que a falta de IL-12 pode condicionar o aumento da carga viral. Avaliando conjuntamente, os grupos com menor nível médio de transcrição da IL-12 (II e III) são os que têm cargas virais superiores (Gráfico nº 4B). Apesar disso, quando observado individualmente, o grupo com menor transcrição da citocina (II) não é o que regista maior carga viral, mas sim o grupo III.

#### **4.4. Comparação da quantificação relativa do IFN- $\gamma$ nos grupos clínicos I, II e III**

Tal como para as citocinas anteriores, também o nível de transcrição do IFN- $\gamma$  não apresentou diferenças significativas entre os três grupos.

O IFN- $\gamma$  é a principal citocina activadora de macrófagos e tem uma função crítica na imunidade inata e na imunidade celular adquirida, actuando nos linfócitos B, linfócitos T, células NK e nos macrófagos. Embora tenha alguma actividade antiviral, não é um interferão antiviral potente. A sua produção é estimulada pela IL-12. A sequência de reacções que envolvem a IL-12 e o IFN- $\gamma$  são centrais para a imunidade celular (Abbas & Lichtman, 2005). O IFN- $\gamma$  actua nas células T<sub>H</sub>2 para inibir a produção de IL-4.

Neste caso, o grupo de infectados com FCoV e assintomáticos (I) é o que regista níveis de transcrição de mRNA mais baixos comparativamente aos outros dois grupos (II, III), embora muito a par do grupo II (Gráfico nº 10). Também se verificou que o grupo III tem nível médio superior, sugerindo que nestes gatos se deu uma resposta celular mais forte/activa, contrariamente ao que se verificou nos estudos de Gelain et al. (2006) e de Giordano e Paltrinieri (2009). Em ambos os estudos, os animais saudáveis infectados com FCoV demonstraram níveis mais elevados de IFN- $\gamma$ , significando que existe uma forte imunidade celular que possivelmente os protege do estabelecimento da PIF. Apesar disto, o valor registado de IFN- $\gamma$  no grupo I pertence apenas a um animal, pelo que não se pode estabelecer nenhuma conclusão. Apesar do animal pertencer ao grupo de assintomáticos e se esperar um nível de transcrição da citocina elevado, talvez os baixos níveis de IFN- $\gamma$  se expliquem pelos altos níveis médios de IL-4 (Gráfico nº 12A), que inibem o estabelecimento de imunidade celular.

Ainda no caso da PIF neurológica, Foley et al. (2003) observaram a expressão de IFN- $\gamma$  aumentada nos cérebros de gatos com PIF generalizada e ligeiramente diminuída em gatos com PIF e sintomatologia neurológica. No presente estudo, o grupo de animais infectados com FCoV e sintomatologia de SNC e ocular apresentou maiores níveis médios de expressão do mRNA deste interferão, comparativamente aos animais saudáveis e aos animais com sintomatologia gastrointestinal.

Por outro lado, a eficiência dos *primers* utilizados para a transcrição do IFN- $\gamma$  foi relativamente baixa (70,4%), o que pode explicar a baixa obtenção de resultados nas amostras.

#### **4.5. Comparação da quantificação relativa do TNF- $\alpha$ nos grupos clínicos I, II e III**

O grupo de animais infectados e aparentemente saudáveis (I), quando comparados com os outros dois grupos (II, III), registou os níveis médios mais elevados da transcrição do TNF- $\alpha$  (Gráfico nº 11) e grupo infectado com alterações de SNC e oculares, demonstrou os níveis mais baixos. Estas diferenças são apenas aparentes porque estatisticamente não se verificaram.

O TNF- $\alpha$  é o principal mediador da resposta inflamatória aguda e o responsável por várias complicações sistémicas nas infecções graves. Esta citocina é principalmente produzida por macrófagos activados mas também por células NK e mastócitos. Tem como função a activação de macrófagos, aumentando a sua própria síntese (Tizard, 2006) e induz a apoptose dos linfócitos T (Takano et al., 2007a). O IFN- $\gamma$  aumenta a sua síntese (Abbas & Lichtman, 2005).

Ao aumentar a adesão dos monócitos às células endoteliais o TNF- $\alpha$  promove a vasculite (Kipar et al., 2005). Esta citocina aumenta a susceptibilidade ao FCoV, agravando a doença (Takano et al., 2007b). Assim, é indicativo de um prognóstico pouco favorável (Kiss et al., 2004). Por outro lado, o TNF- $\alpha$  actua nos neutrófilos aumentando a sua sobrevivência (Takano et al., 2009a), inibindo a sua apoptose.

Kiss e seus colegas (2004) sugeriram que a doença, independentemente da sua forma, está associada a uma forte resposta do mRNA de TNF- $\alpha$  nas células mononucleares periféricas e na falha da indução de mRNA de IFN- $\gamma$ . Com esta suposição, avaliando o resultado do presente estudo, o nível médio da transcrição do TNF- $\alpha$  no grupo I é contraditório já que é o grupo que regista os maiores valores e, simultaneamente, é o composto por animais aparentemente saudáveis. Poder-se-ia supor que o aumento se deve à estimulação da IL-12p35, que é mais elevada em todos os grupos do que a citocina em questão (Gráfico nº 12A, B e C).

Também ao contrário do observado no grupo III, por Kipar et al. (2004) e Takano et al. (2009b) verificaram níveis de transcrição de TNF- $\alpha$  aumentados em gatos com PIF. Foley et al. (2003) verificaram que o TNF- $\alpha$  se encontrava aumentado em gatos com PIF generalizada, moderadamente aumentado em gatos com PIF neurológica e sem aumento nos animais do grupo de controlo. Mais uma vez a medição não está de acordo com os resultados obtidos neste estudo, no qual o grupo com sintomatologia neurológica apresenta

os níveis médios mais baixos da transcrição desta citocina pró-inflamatória. É de referir, mais uma vez, que as medições foram realizadas em tecidos distintos.

O aumento do TNF- $\alpha$  no grupo I não pode ser prontamente explicado. Estes animais podem estar no começo de uma resposta inflamatória inicial por outra razão que não o FCoV ou mesmo pelo FCoV, com macrófagos e células NK activas, numa reacção imune mista que poderá estar a defender os animais, ainda sem sintomatologia. Ou o nível de transcrição superior da IL-12p35 pode ter estimulado a produção do TNF- $\alpha$ . A IL-4 também poderia ter diminuído a expressão do TNF- $\alpha$  nos grupos II e III. Apesar de tudo, as diferenças registadas entre os 3 grupos não foram significativas, pelo que as conclusões podem estar enviesadas pelo baixo número da amostra obtida. Sendo necessário aumentar significativamente o número de indivíduos por grupo para aumentar a robustez da análise.

## **5. Correlação entre citocinas e entre cada citocina e carga viral**

Analisando os resultados da correlação de Spearman verifica-se que as citocinas variam da mesma forma, por exemplo, quando o nível de expressão da IL-4 aumenta, o nível de expressão da IL-12p35 aumenta também (Gráfico nº 13). Ao longo da discussão foram levantadas várias propostas explicativas para os resultados da medição individual das citocinas nos grupos clínicos porque eram díspares ou concordantes com a informação publicada. Quando observadas as hipóteses em conjunto com os resultados da correlação, apenas a correlação entre a IL-4 e IL-10 ( $r=0,783$ ;  $p=0,003$ ) parece fazer sentido já que ambas fazem parte da resposta humoral, com efeitos semelhantes.

A correlação entre IL-4 e IL-12p35 ( $r=0,971$ ;  $p=0,000$ ) é perfeita, sugerindo que quando a transcrição da IL-4 aumenta, a da IL-12p35 aumenta também. Talvez neste caso, o grande aumento de uma das citocinas fez com que a outra aumentasse também, de forma a acompanhar e equilibrar esta subida. Isto porque estas citocinas, em condições fisiológicas, antagonizam-se.

A correlação entre IL-10 e IL-12p35 ( $r=0,727$ ;  $p=0,007$ ) sugere que quando a transcrição de uma aumenta, a outra também. Sabe-se a IL-10 inibe a produção de IL-12 (Abbas & Litchman, 2006) pelo que este resultado parece não ser correcto, ou colocando a mesma hipótese da correlação anterior, aumentam as duas por compensação.

Para ajudar a compreender melhor estes resultados, a amostra estudada teria que ser consideravelmente superior e proveniente de animais cujas informações de origem e de estado de saúde seriam bem conhecidas.

## 6. Considerações finais

O estabelecimento de um padrão imunitário definitivo em gatos com PIF é de extrema complexidade. O estudo individual do funcionamento de cada citocina auxilia na compreensão da imunidade mas esse mesmo funcionamento é função da regulação de outras citocinas, entre outros participantes da resposta imune. Apesar da tentativa de realizar o estudo com grupos com a maior homogeneidade possível, observou-se muita variabilidade nos níveis de transcrição individual. Também noutros estudos observou-se esse mesmo problema (Kipar et al., 2001; Gelain et al., 2006). Uma gama tão ampla de variações biológicas nos níveis das citocinas torna muito difícil a realização de estudos comparativos, especialmente em doenças causadas por exposição natural ao agente causal (Kipar et al., 2006b). Para além disso, as comparações foram elaboradas com estudos realizados em tecidos distintos. Berg et al. (2005) afirmam que os perfis de citocinas determinados em amostras de tecidos com lesões inflamatórias relevantes vão reflectir a resposta local das citocinas de melhor forma.

A carga viral entre os três grupos revelou-se sem diferenças significativas pelo que fica por responder qual o seu papel no desenvolvimento e manutenção da doença. Já nos perfis de citocinas, o TNF- $\alpha$  revelou-se inesperadamente elevado em animais naturalmente infectados e assintomáticos e diminuído nos dois grupos naturalmente infectados mas com sintomatologia suspeita de PIF, sendo necessário um estudo mais profundo deste detalhe para confirmar se esta diferença com o já publicado foi enviesada pelas características deste estudo ou se realmente se confirma e se abrem novas sugestões ao funcionamento da imunidade face à infecção pelo FCoV.

Os perfis da expressão de citocinas sugerem uma resposta predominantemente celular nos grupos I e III e mista no grupo II, apesar de não terem sido validados estatisticamente.

A manifestação neurológica e ocular da PIF carece de informação sobre o seu perfil imunitário. Neste estudo fez-se uma tentativa de comparação da carga viral e do perfil de citocinas em animais com este tipo de manifestação clínica. Até agora os estudos elaborados que incidem nestas manifestações foram realizados utilizando tecidos como o cérebro ou o LCR (Foley et al., 1998; Foley et al., 2003). Neste trabalho, pelo contrário, utilizaram-se as mesmas amostras de sangue que se utilizaram para os outros grupos, de forma a obter resultados comparáveis. Os resultados sugerem uma resposta imunitária predominantemente celular e os baixos níveis da transcrição de TNF- $\alpha$  não imprimem uma nota de grande gravidade generalizada nestes animais. Neste caso, a extensão da infecção pelo FCoV talvez seja mais controlada e menos evidente sistemicamente. Aparentemente, o perfil imunitário dos animais deste grupo assemelha-se ao dos assintomáticos, sugerindo

que o processo inflamatório se encontra circunscrito no SNC. Assim, são necessários mais estudos para compreender a resposta inflamatória relacionada com a PIF neurológica.

O papel das citocinas na saúde e na doença é muito complexo e apenas ensaios cuidadosamente desenhados e executados podem dar resultados apreciáveis e interpretáveis.

## **VI. CONCLUSÃO**

Pretendeu-se identificar um padrão na resposta imunitária face ao FCoV a partir da quantificação da expressão de mediadores inflamatórios (IL-10, IL-4, IL-12p35, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) de forma a caracterizá-la e relacioná-la com a carga viral e subtipificação viral também obtidos neste trabalho.

A resposta imune face a um vírus resulta de uma interacção complexa entre diferentes células e as moléculas que elas produzem. Para além disso, muitas das moléculas são redundantes, tendo muitos efeitos diferentes e actuando em diferentes células. Para elucidar melhor a intrigante imunopatogénese da PIF é necessário reconhecer perfis completos de citocinas em tecidos inflamatórios relevantes de um número superior de gatos com as formas da doença mais importantes, com diagnóstico confirmado.

Uma outra vantagem do conhecimento dos perfis de citocinas nestes animais é a abertura à aplicação de terapias imunes que criariam um equilíbrio de citocinas, e que permitiriam ao animal uma maior eficiência na eliminação do vírus, tais como a tilosina e a promodulina (Hartmann & Ritz, 2008) e para oferecer melhor qualidade de vida como a pentoxifilina, inibidor do TNF- $\alpha$  (Fisher et al., 2011). Até agora não existem tratamentos eficazes para curar esta doença e não se pode garantir que animais infectados assintomáticos não venham a desenvolvê-la.

A implementação de medidas de controlo e manejo da infecção pelo FCoV são as ferramentas que poderão ter melhores resultados a longo prazo, visando a diminuição da disseminação e transmissão viral.

Esta doença mantém o seu carácter intrigante e pouco claro, desde que se dá o primeiro contacto com o vírus até ao momento em que ocorre a fatal desregulação do sistema imunitário do hospedeiro que culmina na sua inevitável morte.

## VII. BIBLIOGRAFIA

- Abbas, A.K. & Lichtman, A.M. (2005). *Cellular and Molecular Immunology, updated edition*. (5<sup>th</sup> ed.). (pp. 247 – 269). Philadelphia: Elsevier.
- Addie, D. D. & Jarrett, O. (2001). Use of a reverse-transcriptase polymerase chain reaction for monitoring the shedding of feline coronavirus by healthy cats. *Veterinary Record*, 148, 649–654.
- Addie, D. D. Schaap, I. A. T., Nicolson, L., & Jarrett, O. (2003). Persistence and transmission of natural type I feline coronavirus infection. *The Journal of General Virology*, 84 (Pt 10), 2735–2744.
- Addie, D. D., Paltrinieri, S. & Pedersen, N. C. (2004). Recommendations from workshops of the second international feline coronavirus/feline infectious peritonitis symposium. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 6(2), 125–30.
- Addie, D. A. & Jarrett, O. (2006). Feline Coronavirus Infections. In Greene, C. E., *Infectious diseases of the dog and cat*. (3rd ed.). (pp. 88 – 102). Missouri: Elsevier.
- Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., et al. (2009). Feline Infectious Peritonitis. ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11, 594 – 604.
- Amer, A., Suri, A. S., Rahman, O. A., Mohd, H. B., Faruku, B., Saeed, S., Ibrahim, T., et al. (2012). Isolation and molecular characterization of type I and type II feline coronavirus in Malaysia. *Virology Journal*, 9(1), 1.
- An, D.-J., Jeoung, H.-Y., Jeong, W., Park, J.-Y., Lee, M.-H. & Park, B.-K. (2011). Prevalence of Korean cats with natural feline coronavirus infections. *Virology Journal*, 8(1), 455.
- Bálint, Á., Farsang, A., Zádori, Z., Hornyák, Á., Dencso, L., Almazán, F. & Belák, S. (2012). Molecular characterization of feline infectious peritonitis virus strain DF-2 and studies of the role of ORF3abc in viral cell tropism. *Journal of Virology*, 86(11), 6258–67.
- Barker, E. N., Tasker, S., Gruffydd-Jones, T. J., Tuplin, C. K., Burton, K., Porter, E. & Siddell, S. G. (2013). Phylogenetic analysis of feline coronavirus strains in an epizootic outbreak of feline infectious peritonitis. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 27(3), 445–50.
- Battilani, M., Coradin, T., Scagliarini, A., Ciulli, S., Ostanello, F., Prosperi, S. & Morganti, L. (2003). Quasispecies composition and phylogenetic analysis of feline coronaviruses (FCoVs) in naturally infected cats. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 39(2), 141–147.
- Bell, E. T., Toribio, J. A. L. M. L., White, J. D., Malik, R. & Norris, J. M. (2006). Seroprevalence study of feline coronavirus in owned and feral cats in Sydney, Australia. *Australian Veterinary Journal*, 84(3), 74–81.
- Benetka, V., Kübber-heiss, A., Kolodziejek, J., Nowotny, N., Hofmann-parisot, M. & Möstl, K. (2004). Prevalence of feline coronavirus types I and II in cats with histopathologically verified feline infectious peritonitis. *Veterinary Microbiology*, 99, 31–42.

- Berg, A. L., Ekman, K., Belak, S. & Berg, M. (2005). Cellular composition and interferon-gamma expression of the local inflammatory response in feline infectious peritonitis (FIP). *Veterinary Microbiology*, 111(1-2), 15–23.
- Boettcher, I. C., Steinberg, T., Matiassek, K., Greene, C. E., Hartmann, K. & Fischer, A. (2007). Use of anti-coronavirus antibody testing of cerebrospinal fluid for diagnosis of feline infectious peritonitis involving the central nervous system in cats. *Journal of the American Veterinary Medicine Association*, 230(2), 199–205.
- Bosch, B. J., Zee, R. Van Der, de Haan, C. A. M. & Rottier, P. J. M. (2003). The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein : structural and functional characterization of the fusion core complex. *Journal of Virology*, 77(16), 8801–8811.
- Brown, M. A., Troyer, J. L., Pecon-Slattery, J., Roelke, M. E. & O'Brien, S. J. (2009). Genetics and pathogenesis of feline infectious peritonitis virus. *Emerging Infectious Diseases*, 15(9), 1445–1452.
- Brown, M. A. (2011). Genetic determinants of pathogenesis by feline infectious peritonitis virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 143(3-4), 265–8.
- Casanova, L., Rutala, W. A., Weber, D. J. & Sobsey, M. D. (2009). Survival of surrogate coronaviruses in water. *Water Research*, 43(7), 1893–8.
- Casanova, L. M., Jeon, S., Rutala, W. A., Weber, D. J. & Sobsey, M. D. (2010). Effects of air temperature and relative humidity on coronavirus survival on surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(9), 2712–7.
- Can-Sahna, K., Soydal Ataseven, V., Pinar, D. & Oğuzoğlu, T. C. (2007). The detection of feline coronaviruses in blood samples from cats by mRNA RT-PCR. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 9(5), 369–72.
- Cannon, M. J., Silkstone, M. A. & Kipar, A. M. (2005). Cutaneous lesions associated with coronavirus-induced vasculitis in a cat with feline infectious peritonitis and concurrent feline immunodeficiency virus infection. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 7(4), 233–6.
- Carstens, E. B. (2010). Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). *Archives of Virology*, 155(1), 133–46.
- Cave, T. A., Golder, M. C., Simpson, J. & Addie, D. D. (2004). Risk factors for feline coronavirus seropositivity in cats relinquished to a UK rescue charity. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 6(2), 53–8.
- Chang, H.-W., de Groot, R. J., Egberink, H. F. & Rottier, P. J. M. (2010). Feline infectious peritonitis: insights into feline coronavirus pathobiogenesis and epidemiology based on genetic analysis of the viral 3c gene. *The Journal of General Virology*, 91(Pt 2), 415–20.
- Chang, H.-W., Egberink, H. F., Halpin, R., Spiro, D. J. & Rottier, P. J. M. (2012). Spike protein fusion peptide and feline coronavirus virulence. *Emerging Infectious Diseases*, 18(7), 1089–95.



- Cornelissen, E., Dewerchin, H. L., Van Hamme, E. & Nauwynck, H. J. (2007). Absence of surface expression of feline infectious peritonitis virus (FIPV) antigens on infected cells isolated from cats with FIP. *Veterinary Microbiology*, 121(1-2), 131–7.
- de Groot-Mijnes, J., Dun, J. M. V. A. N., Robbert, G. & Groot, R. J. D. E. (2005). Natural history of a recurrent feline coronavirus infection and the role of cellular immunity in survival and disease. *Journal of Virology*, 79(2), 1036–1044.
- Dean, G. A., Higgins, J., Lavoy, A., Fan, Z. & Pedersen, N. C. (1998). Measurement of feline cytokine gene expression by quantitative-competitive RT-PCR. *Veterinary Dermatology*, 63, 73–82.
- Dean, G. A., Olivry, T., Stanton, C. & Pedersen, N. C. (2003). In vivo cytokine response to experimental feline infectious peritonitis virus infection. *Veterinary Microbiology*, 97(1-2), 15–23.
- Declercq, J., De Bosschere, H., Schwarzkopf, I. & Declercq, L. (2008). Papular cutaneous lesions in a cat associated with feline infectious peritonitis. *Veterinary Dermatology*, 19(5), 255–258.
- Dewerchin, H. L., Cornelissen, E. & Nauwynck, H. J. (2005). Replication of feline coronaviruses in peripheral blood monocytes. *Archives of virology*, 150(12), 2483–500.
- Dewerchin, H. L., Cornelissen, E. & Nauwynck, H. J. (2006). Feline infectious peritonitis virus-infected monocytes internalize viral membrane-bound proteins upon antibody addition. *The Journal of General Virology*, 87(Pt 6), 1685–90.
- Dewerchin, H. L., Cornelissen, E., Van Hamme, E., Smits, K., Verhasselt, B. & Nauwynck, H. J. (2008). Surface-expressed viral proteins in feline infectious peritonitis virus-infected monocytes are internalized through a clathrin- and caveolae-independent pathway. *The Journal of General Virology*, 89 (Pt 11), 2731–40.
- Diaz, J. V. & Poma, R. (2009). Diagnosis and clinical signs of feline infectious peritonitis in the central nervous system. *The Canadian Veterinary Journal*, 50, 1091–1093.
- Dye, C., Temperton, N. & Siddell, S. G. (2007). Type I feline coronavirus spike glycoprotein fails to recognize aminopeptidase N as a functional receptor on feline cell lines. *The Journal of General Virology*, 88(Pt 6), 1753–60.
- Dye, C., Helps, C. R. & Siddell, S. G. (2008). Evaluation of real-time RT-PCR for the quantification of FCoV shedding in the faeces of domestic cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 10(2), 167–74.
- Duarte, A., Veiga, I. & Tavares, L. (2009). Genetic diversity and phylogenetic analysis of Feline Coronavirus sequences from Portugal. *Veterinary Microbiology*, 138(1-2), 163–168.
- Duarte, A., Fernandes, M., Santos, N. & Tavares, L. (2012). Virological survey in free-ranging wildcats (*Felis silvestris*) and feral domestic cats in Portugal. *Veterinary Microbiology*, 158(3-4), 400–404.

- Egberink, H. F., Herrewegh, a P. M., Schuurman, N. M. P., van der Linde-Sipman, J. S., Horzinek, M. C. & de Groot, R. J. (1995). FIP, easy to diagnose? *The Veterinary Quarterly*, 17, 24–25.
- Eifart, P., Ludwig, K., Böttcher, C., De Haan, C. a M., Rottier, P. J. M., Korte, T. & Herrmann, A. (2007). Role of endocytosis and low pH in murine hepatitis virus strain A59 cell entry. *Journal of Virology*, 81(19), 10758–68.
- FIPV Research Group at Ghent University (2008) *The UGent FIP research group*. Acedido em Junho de 2013, disponível em: <http://www.fipv.ugent.be/index.html>
- Fischer, Y., Ritz, S., Weber, K., Sauter-Louis, C. & Hartmann, K. (2011). Randomized, placebo controlled study of the effect of propentofylline on survival time and quality of life of cats with feline infectious peritonitis. *Journal of Veterinary Internal Medicine/American College of Veterinary Internal Medicine*, 25(6), 1270–6.
- Fischer, Y., Sauter-Louis, C., & Hartmann, K. (2012). Diagnostic accuracy of the Rivalta test for feline infectious peritonitis. *Veterinary Clinical Pathology*, 41(4), 558–67.
- Foley, J. E., Poland, A, Carlson J. & Pedersen, N.C. (1997a). Patterns of feline coronavirus infection and fecal shedding from cats in multiple-cat environments. *Journal of the American Veterinary Medicine Association*, 210, 1307-1312.
- Foley, J. E., Poland, A, Carlson J. & Pedersen, N.C. (1997b). Risk factors for feline infectious peritonitis among cats in multiple-cat environments with endemic feline enteric coronavirus. *Journal of the American Veterinary Medicine Association*, 210, 1313-1318.
- Foley, J. E., Lapointe, J. M., Koblik, P., Poland, A. & Pedersen, N. C. (1998). Diagnostic features of clinical neurologic feline infectious peritonitis. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 12(6), 415–23.
- Foley, J., Rand, C. & Leutenegger, C. (2003). Inflammation and changes in cytokine levels in neurological feline infectious peritonitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 5(6), 313–322.
- Gelain, M. E., Meli, M. & Paltrinieri, S. (2006). Whole blood cytokine profiles in cats infected by feline coronavirus and healthy non-FCoV infected specific pathogen-free cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 8(6), 389–99.
- Giordano, A., Spagnolo, V., Colombo, A. & Paltrinieri, S. (2004). Changes in some acute phase protein and immunoglobulin concentrations in cats affected by feline infectious peritonitis or exposed to feline coronavirus infection. *The Veterinary Journal*, 167(1), 38–44.
- Giordano, A. & Paltrinieri, S. (2009). Interferon-gamma in the serum and effusions of cats with feline coronavirus infection. *Veterinary Journal*, 180(3), 396–398.
- Giori, L., Giordano, A, Giudice, C., Grieco, V. & Paltrinieri, S. (2011). Performances of different diagnostic tests for feline infectious peritonitis in challenging clinical cases. *The Journal of Small Animal Practice*, 52(3), 152–7.

- Goitsuka, R., Ohashi, T., Ono, K., Yasukawa, K., Koishibara, Y., Fukui, H. & Hasegawa, A. (1990). IL-6 activity in feline infectious peritonitis. *Journal of Immunology*, 144(7), 2599–603.
- Golovko, L., Lyons, L. A, Liu, H., Sørensen, A., Wehnert, S., & Pedersen, N. C. (2013). Genetic susceptibility to feline infectious peritonitis in Birman cats. *Virus Research*, 175(1), 58–63.
- Graham, R. L. & Baric, R. S. (2010). Recombination, reservoirs, and the modular spike: mechanisms of coronavirus cross-species transmission. *Journal of Virology*, 84(7).
- Haagmans, B. L., Egberink, H. F. & Horzinek, M. C. (1996). Apoptosis and T-cell depletion during feline infectious peritonitis. *Journal of Virology*, 70(12), 8977–83.
- Hagemeijer, M. C., Rottier, P. J. M. & de Haan, C. A. M. (2012). Biogenesis and dynamics of the coronavirus replicative structures. *Viruses*, 4(11), 3245–69.
- Hartmann, K., Binder, C., Hirschberger, J., Cole, D., Reinacher, M., Schroo, S. & Hermanns, W. (2003). Comparison of different tests to diagnose feline infectious peritonitis. *Journal of Veterinary Internal Medicine/American College of Veterinary Internal Medicine*, 17(6), 781–90.
- Hartmann, K. & Ritz, S. (2008). Treatment of cats with feline infectious peritonitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 123(1-2), 172–175.
- Hartmann, K. (2010). Feline Infectious Peritonitis and Feline Coronavirus Infections. In Ettinger, S.J. & Feldman, E. C., *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. (7<sup>th</sup> ed.). (pp. 940 – 945). Missouri: Saunders.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6(10), 986–994.
- Herrewegh, A. A., De Groot, R. J., Cepica, A., Egberink, H. F., Horzinek, M. C. & Rottier, P. J. (1995). Detection of feline coronavirus RNA in feces, tissues, and body fluids of naturally infected cats by reverse transcriptase PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(3), 684–689.
- Herrewegh, A. A., Mähler, M., Hedrich, H. J., Haagmans, B. L., Egberink, H. F., Horzinek, M. C., Rottier, P. J., *et al.* (1997). Persistence and evolution of feline coronavirus in a closed cat-breeding colony. *Virology*, 234(2), 349–363.
- Holst, B. S., Englund, L., Palacios, S., Renström, L. & Berndtsson, L. T. (2006). Prevalence of antibodies against feline coronavirus and *Chlamydomydia felis* in Swedish cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 8(3), 207–11.
- Hora, A. S., Asano, K. M., Guerra, J. M., Mesquita, R. G., Maiorka, P., Richtzenhain, L. J. & Brandão, P. E. (2013). Intrahost diversity of feline coronavirus: a consensus between the circulating virulent/avirulent strains and the internal mutation hypotheses? *The Scientific World Journal*, 2013, 572325.

- Hornyák, A., Bálint, A., Farsang, A., Balka, G., Hakhverdyan, M., Rasmussen, T. B., Blomberg, J., *et al.* (2012). Detection of subgenomic mRNA of feline coronavirus by real-time polymerase chain reaction based on primer-probe energy transfer (P-sg-QPCR). *Journal of Virological Methods*, 181(2), 155–163.
- Ives, E. J., Vanhaesebrouck, A. E. & Cian, F. (2013). Immunocytochemical demonstration of feline infectious peritonitis virus within cerebrospinal fluid macrophages. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 0(0), 1 – 5.
- Kennedy, M., Boedeker, N., Gibbs, P. & Kania, S. (2001). Deletions in the 7a ORF of feline coronavirus associated with an epidemic of feline infectious peritonitis. *Veterinary Microbiology*, 81(3), 227–34.
- Kennedy, M. A. (2009). Peer- Review: Atualização sobre a peritonite infecciosa dos felinos. *Veterinary Medicine (Edição Portuguesa)*, vol. 12, 65-74.
- Kessler, Y., Helfer-Hungerbuehler, A. K., Cattori, V., Meli, M. L., Zellweger, B., Ossent, P. & Hofmann-Lehmann, R. (2009). Quantitative TaqMan® real-time PCR assays for gene expression normalisation in feline tissues. *BMC Molecular Biology*, 10(106).
- Kipar, A., Koehler, K., Bellmann, S. & Reinacher, M. (1999). Feline infectious peritonitis presenting as a tumour in the abdominal cavity. *The Veterinary Record*, 144(5), 118–22.
- Kipar, A., Leutenegger, C. M., Hetzel, U., Akens, M. K., Mislin, C. N., Reinacher, M. & Lutz, H. (2001). Cytokine mRNA levels in isolated feline monocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 78(3-4), 305–315.
- Kipar, A., May, H., Menger, S., Weber, M., Leukert, W. & Reinacher, M. (2005). Morphologic features and development of granulomatous vasculitis in feline infectious peritonitis. *Veterinary Pathology Online*, 42(3), 321 – 330.
- Kipar, A., Baptiste, K., Barth, A. & Reinacher, M. (2006a). Natural FCoV infection: cats with FIP exhibit significantly higher viral loads than healthy infected cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 8(1), 69–72.
- Kipar, A., Meli, M. L., Failing, K., Euler, T., Gomes-Keller, M. A., Schwartz, D. & Reinacher, M. (2006b). Natural feline coronavirus infection: differences in cytokine patterns in association with the outcome of infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 112(3-4), 141–155.
- Kipar, A., Meli, M. L., Baptiste, K. E., Bowker, L. J. & Lutz, H. (2010). Sites of feline coronavirus persistence in healthy cats. *The Journal of General Virology*, 91(Pt 7), 1698–707.
- Kiss, I., Poland, A. M. & Pedersen, N. C. (2004). Disease outcome and cytokine responses in cats immunized with an avirulent feline infectious peritonitis virus (FIPV)-UCD1 and challenge-exposed with virulent FIPV-UCD8. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 6(2), 89–97.
- Knipe, D.M. & Howley, P.M. (2007) *Fields Virology*. (5<sup>th</sup> ed). (pp. 1306 – 1320). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

- Kohn, B., Linden, T. & Leibold, W. (2006). Platelet-bound antibodies detected by a flow cytometric assay in cats with thrombocytopenia. *Journal of feline medicine and surgery*, 8(4), 254–60.
- Kummrow, M., Meli, M. L., Haessig, M., Goenczi, E., Poland, A., Pedersen, N. C., Hofmann-Lehmann, R., *et al.* (2005). Feline coronavirus serotypes 1 and 2: seroprevalence and association with disease in Switzerland. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(10), 1209–1215.
- Lazarski, C. A., Ford, J., Katzman, S. D., Rosenberg, A. F. & Fowell, D. J. (2013). IL-4 attenuates Th1-associated chemokine expression and Th1 trafficking to inflamed tissues and limits pathogen clearance. *PloS one*, 8(8), e71949.
- Le Poder, S. (2011). Feline and canine coronaviruses: common genetic and pathobiological features. *Advances in Virology*, 2011.
- Legendre, A. M. & Bartges, J. W. (2009). Effect of Polyprenyl Immunostimulant on the survival times of three cats with the dry form of feline infectious peritonitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11(8), 624–6.
- Lewis, K. M. & O'Brien, R. T. (2010). Abdominal ultrasonographic findings associated with feline infectious peritonitis: a retrospective review of 16 cases. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 46(3), 152–60.
- Licitra, B. N., Millet, J. K., Regan, A. D., Hamilton, B. S., Rinaldi, V. D., Duhamel, G. E. & Whittaker, G. R. (2013). Mutation in spike protein cleavage site and pathogenesis of feline coronavirus. *Emerging Infectious Diseases*, 19(7), 1066–73.
- Lin, C.-N., Su, B.-L., Huang, H.-P., Lee, J.-J., Hsieh, M.-W. & Chueh, L.-L. (2009a). Field strain feline coronaviruses with small deletions in ORF7b associated with both enteric infection and feline infectious peritonitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11(6), 413–9.
- Lin, C.-N., Su, B.-L., Wang, C.-H., Hsieh, M.-W., Chueh, T.-J. & Chueh, L.-L. (2009b). Genetic diversity and correlation with feline infectious peritonitis of feline coronavirus type I and II: a 5-year study in Taiwan. *Veterinary Microbiology*, 136(3-4), 233–9.
- Male, D., Brostoff, J., Roth, D. B. & Roitt, I. (2006). *Immunology*. (7<sup>th</sup> ed.). (pp. 215 – 256). Canada: Elsevier Ltd.
- McDonagh, P., Sheehy, P. A. & Norris, J. M. (2011). In vitro inhibition of feline coronavirus replication by small interfering RNAs. *Veterinary Microbiology*, 150(3-4), 220–9.
- Meli, M., Kipar, A., Müller, C., Jenal, K., Gönczi, E., Borel, N., Gunn-Moore, D., *et al.* (2004). High viral loads despite absence of clinical and pathological findings in cats experimentally infected with feline coronavirus (FCoV) type I and in naturally FCoV-infected cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 6(2), 69–81.
- Meli, M. L., Burr, P., Decaro, N., Graham, E., Jarrett, O., Lutz, H. & Addie, D. D. (2013). Samples with high virus load cause a trend toward lower signal in feline coronavirus antibody tests. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 15(4), 295–9.

- Moore, K. W., Malefyt, R. D. W., Robert, L. & Garra, A. O. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology*, 19, 683–765.
- Mota, A.L.D.R. (2010) *Relação entre apresentação clínica, carga viral e a titulação de anticorpos na peritonite infecciosa felina*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Myrrha, L. W., Silva, F. M. F., Peternelli, E. F. D. O., Junior, A. S., Resende, M. & De Almeida, M. R. (2011). The paradox of feline coronavirus pathogenesis: a review. *Advances in virology Virol*, 2011, 1 – 8.
- Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J., Horzinek, M.C. & Studdert, M.J. (1999) *Veterinary Virology*. (3rd ed). London: Academic Press.
- Paltrinieri, S., Cammarata, M. P., Cammarata, G. & Comazzi, S. (1998a). Some aspects of humoral and cellular immunity in naturally occurring feline infectious peritonitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 65, 205–220.
- Paltrinieri, S., Cammarata Parodi, M., Cammarata, G. & Mambretti, M. (1998b). Type IV hypersensitivity in the pathogenesis of FIPV-induced lesions. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of Veterinary Medicine. Series B*, 45(3), 151–9.
- Paltrinieri, S., Grieco, V., Comazzi, S. & Cammarata Parodi, M. (2001). Laboratory profiles in cats with different pathological and immunohistochemical findings due to feline infectious peritonitis (FIP). *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 3(3), 149–59.
- Paltrinieri, S., Ponti, W., Comazzi, S., Giordano, A. & Poli, G. (2003). Shifts in circulating lymphocyte subsets in cats with feline infectious peritonitis (FIP): pathogenic role and diagnostic relevance. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 96(3-4), 141–148.
- Paltrinieri, S., Metzger, C., Battilani, M., Pocacqua, V., Gelain, M. E. & Giordano, A. (2007). Serum alpha1-acid glycoprotein (AGP) concentration in non-symptomatic cats with feline coronavirus (FCoV) infection. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 9(4), 271–7.
- Pedersen, N. C., Sato, R., Foley, J. E. & Poland, A. M. (2004). Common virus infections in cats, before and after being placed in shelters, with emphasis on feline enteric coronavirus. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 6(2), 83–88.
- Pedersen, N. C., Allen, C. E. & Lyons, L. A. (2008). Pathogenesis of feline enteric coronavirus infection. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 10(6), 529–41.
- Pedersen, N. C. (2009a). A review of feline infectious peritonitis virus infection: 1963-2008. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11(4), 225–58.
- Pedersen, N. C., Liu, H., Dodd, K. A. & Pesavento, P. A. (2009b). Significance of coronavirus mutants in feces and diseased tissues of cats suffering from feline infectious peritonitis. *Viruses*, 1(2), 166–84.

- Pedersen, N. C., Liu, H., Scarlett, J., Leutenegger, C. M., Golovko, L., Kennedy, H. & Kamal, F. M. (2012). Feline infectious peritonitis: role of the feline coronavirus 3c gene in intestinal tropism and pathogenicity based upon isolates from resident and adopted shelter cats. *Virus Research*, 165(1), 17–28.
- Pesteanu-Somogyi, L. D., Radzai, C. & Pressler, B. M. (2006). Prevalence of feline infectious peritonitis in specific cat breeds \*. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 8, 1–5.
- Peterson, J. L., Couto, C. G. & Wellman, M. L. (1995). Hemostatic disorders in cats: A retrospective study and review of the literature. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 9, 298–303.
- Pfizer Animal Health Information (2008). *Pfizer Animal Health US, Cats product overview. Primucell® PIF*. Acedido em Agosto, 25, 2013, disponível em: [http://www.pfizerah.com/Print\\_Friendly.aspx?drug=pp&country=us&lang=en&species=fl&s=/product\\_overview.aspx](http://www.pfizerah.com/Print_Friendly.aspx?drug=pp&country=us&lang=en&species=fl&s=/product_overview.aspx)
- Pratelli, A. (2008). Comparison of serologic techniques for the detection of antibodies against feline coronaviruses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20(1), 45–50.
- Regan, A. D., Shraybman, R., Cohen, R. D. & Whittaker, G. R. (2008). Differential role for low pH and cathepsin-mediated cleavage of the viral spike protein during entry of serotype II feline coronaviruses. *Veterinary Microbiology*, 132(3-4), 235–48.
- Regan, A. D., Cohen, R. D. & Whittaker, G. R. (2009). Activation of p38 MAPK by feline infectious peritonitis virus regulates pro-inflammatory cytokine production in primary blood-derived feline mononuclear cells. *Virology*, 384(1), 135–143.
- Regan, A. D., Ousterout, D. G. & Whittaker, G. R. (2010). Feline lectin activity is critical for the cellular entry of feline infectious peritonitis virus. *Journal of Virology*, 84(15), 7917–21.
- Ritz, S., Egberink, H. & Hartmann, K. (2007). Effect of Feline Interferon-Omega on the Survival Time and Quality of Life of Cats with Feline Infectious Peritonitis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21, 1193–1197.
- Rohrbach, B. W., Legendre, A. M., Baldwin, C. A., Lein, D. H., Reed, W. M. & Wilson, R. B. (2001). Epidemiology of feline infectious peritonitis among cats examined at veterinary medical teaching hospitals. *Journal of the American Veterinary Medicine Association*, 218(7), 1111–1115.
- Rota, A., Paltrinieri, S., Jussich, S., Ubertaini, G. & Appino, S. (2008). Priapism in a castrated cat associated with feline infectious peritonitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 10(2), 181–4.
- Rottier, P. J. (1999). The molecular dynamics of feline coronaviruses. *Veterinary Microbiology*, 69(1-2), 117–25.
- Rottier, P. J. M., Nakamura, K., Schellen, P., Volders, H. & Haijema, B. J. (2005). Acquisition of macrophage tropism during the pathogenesis of feline infectious peritonitis is determined by mutations in the feline coronavirus spike protein. *Journal of Virology*, 79(22), 14122–14130.

- Saverio, P., Alessia, G., Vito, T. & Stefano, G. (2007). Critical assessment of the diagnostic value of feline 1-acid glycoprotein for feline infectious peritonitis using the likelihood ratios approach. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19(3), 266–272.
- Scott, V. L., Shack, L. A., Eells, J. B., Ryan, P. L., Donaldson, J. R. & Coats, K. S. (2011). Immunomodulator expression in trophoblasts from the feline immunodeficiency virus (FIV)-infected cat. *Virology Journal*, 8(1), 336.
- Sharif, S., Arshad, S. S., Hair-Bejo, M., Omar, A. R., Zeenathul, N. A, Fong, L. S. & Isa, M.-K. A. (2010a). Descriptive distribution and phylogenetic analysis of feline infectious peritonitis virus isolates of Malaysia. *Acta veterinaria Scandinavica*, 52, 1.
- Sharif, S., Arshad, S. S., Hair-Bejo, M., Omar, A. R., Zeenathul, N. A. & Alazawy, A. (2010b). Diagnostic methods for feline coronavirus: a review. *Veterinary Medicine International*, 2010, 1–7.
- Sharif, S., Arshad, S. S., Hair-Bejo, M., Omar, A. R., Zeenathul, N. A., Rahman, N.-A. & Amer, A. (2011). Evaluation of feline coronavirus viraemia in clinically healthy and ill cats with feline infectious peritonitis. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10, 18 – 22.
- Shiba, N., Maeda, K., Kato, H., Mochizuki, M. & Iwata, H. (2007). Differentiation of feline coronavirus type I and II infections by virus neutralization test. *Veterinary Microbiology*, 124(3-4), 348–52.
- Simons, F. A, Vennema, H., Rofina, J. E., Pol, J. M., Horzinek, M. C., Rottier, P. J. M. & Egberink, H. F. (2005). A mRNA PCR for the diagnosis of feline infectious peritonitis. *Journal of Virological Methods*, 124(1-2), 111–116.
- Soma, T., Wada, M., Taharaguchi, S. & Tajima, T. (2013). Detection of ascitic feline coronavirus RNA from clinically suspected cats of feline infectious peritonitis. *The Journal of Veterinary Medical Science, Advance Publication*
- Taglinger, K., Van Nguyen, N., Helps, C. R., Day, M. J. & Foster, A. P. (2008). Quantitative real-time RT-PCR measurement of cytokine mRNA expression in the skin of normal cats and cats with allergic skin disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 122(3-4), 216–30.
- Takano, T., Hohdatsu, T., Hashida, Y., Kaneko, Y., Tanabe, M. & Koyama, H. (2007a). A “possible” involvement of TNF-alpha in apoptosis induction in peripheral blood lymphocytes of cats with feline infectious peritonitis. *Veterinary Microbiology*, 119(2-4), 121–131.
- Takano, T., Hohdatsu, T., Toda, A., Tanabe, M. & Koyama, H. (2007b). TNF-alpha, produced by feline infectious peritonitis virus (FIPV)-infected macrophages, upregulates expression of type II FIPV receptor feline aminopeptidase N in feline macrophages. *Virology*, 364(1), 64–72.
- Takano, T., Katada, Y., Moritoh, S., Ogasawara, M., Satoh, K., Satoh, R., Tanabe, M., *et al.* (2008a). Analysis of the mechanism of antibody-dependent enhancement of feline infectious peritonitis virus infection: aminopeptidase N is not important and a process of acidification of the endosome is necessary. *The Journal of General Virology*, 89(Pt 4), 1025–1029.



- Takano, T., Kawakami, C., Yamada, S., Satoh, R. & Hohdatsu, T. (2008b). Antibody-dependent enhancement occurs upon re-infection with the identical serotype virus in feline infectious peritonitis virus infection. *The Journal of Veterinary Medical Science the Japanese Society of Veterinary Science*, 70(12), 1315–1321.
- Takano, T., Azuma, N., Hashida, Y., Satoh, R. & Hohdatsu, T. (2009a). B-cell activation in cats with feline infectious peritonitis (FIP) by FIP-virus-induced B-cell differentiation/survival factors. *Archives of Virology*, 154(1), 27–35.
- Takano, T., Azuma, N., Satoh, M., Toda, A., Hashida, Y., Satoh, R. & Hohdatsu, T. (2009b). Neutrophil survival factors (TNF-alpha, GM-CSF, and G-CSF) produced by macrophages in cats infected with feline infectious peritonitis virus contribute to the pathogenesis of granulomatous lesions. *Archives of Virology*, 154(5), 775–781.
- Takano, T., Tomiyama, Y., Katoh, Y., Nakamura, M., Satoh, R. & Hohdatsu, T. (2011a). Mutation of neutralizing/antibody-dependent enhancing epitope on spike protein and 7b gene of feline infectious peritonitis virus: influences of viral replication in monocytes/macrophages and virulence in cats. *Virus Research*, 156(1-2), 72–80.
- Takano, T., Ohya, T., Kokumoto, A., Satoh, R. & Hohdatsu, T. (2011b). Vascular endothelial growth factor (VEGF), produced by feline infectious peritonitis (FIP) virus-infected monocytes and macrophages, induces vascular permeability and effusion in cats with FIP. *Virus Research*, 158(1-2), 161–168.
- Takano, T., Katoh, Y., Doki, T. & Hohdatsu, T. (2013). Effect of chloroquine on feline infectious peritonitis virus infection in vitro and in vivo. *Antiviral Research*, 99(2), 100–107.
- Tammer, R., Evensen, O., Lutz, H. & Reinacher, M. (1995). Immunohistological demonstration of feline infectious peritonitis virus antigen in paraffin-embedded tissues using feline ascites or murine monoclonal antibodies. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 49(1-2), 177–82.
- Tanaka, Y., Sato, Y., Osawa, S., Inoue, M., Tanaka, S. & Sasaki, T. (2012). Suppression of feline coronavirus replication in vitro by cyclosporin A. *Veterinary Research*, 43(1), 41.
- Tanaka, Y., Sato, Y. & Sasaki, T. (2013). Suppression of coronavirus replication by cyclophilin inhibitors. *Viruses*, 5(5), 1250–60.
- Tekes, G., Hofmann-Lehmann, R., Stallkamp, I., Thiel, V. & Thiel, H.-J. (2008). Genome organization and reverse genetic analysis of a type I feline coronavirus. *Journal of Virology*, 82(4), 1851–9.
- Tekes, G., Hofmann-Lehmann, R., Bank-Wolf, B., Maier, R., Thiel, H.-J. & Thiel, V. (2010). Chimeric feline coronaviruses that encode type II spike protein on type I genetic background display accelerated viral growth and altered receptor usage. *Journal of Virology*, 84(3), 1326–33.
- Terada, Y., Shiozaki, Y., Shimoda, H., Mahmoud, H. Y. A. H., Noguchi, K., Nagao & Y. Maeda, K. (2012). Feline infectious peritonitis virus with a large deletion in the 5'-terminal region of the spike gene retains its virulence for cats. *The Journal of General Virology*, 93(Pt 9), 1930–4.

- Timmann, D., Cizinauskas, S., Tomek, A., Doherr, M., Vandewelde, M. & Jaggy, A. (2008). Retrospective analysis of seizures associated with feline infectious peritonitis in cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 10(1), 9–15.
- Tizard, I.R. (2006). *Veterinary Immunology*. (7<sup>th</sup>). Philadelphia: Saunders.
- Trotman, T. K., Mauldin, E., Hoffmann, V., Del Piero, F. & Hess, R. S. (2007). Skin fragility syndrome in a cat with feline infectious peritonitis and hepatic lipidosis. *Veterinary Dermatology*, 18(5), 365–9.
- VanGuilder, H. D., Vrana, K. E. & Freeman, W. M. (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques*, 44(5), 619–26.
- Van Hamme, E., Dewerchin, H. L., Cornelissen, E. & Nauwynck, H. J. (2007). Attachment and internalization of feline infectious peritonitis virus in feline blood monocytes and Crandell feline kidney cells. *The Journal of General Virology*, 88(Pt 9), 2527–32.
- Van Hamme, E., Dewerchin, H. L., Cornelissen, E., Verhasselt, B. & Nauwynck, H. J. (2008). Clathrin- and caveolae-independent entry of feline infectious peritonitis virus in monocytes depends on dynamin. *The Journal of General Virology*, 89(Pt 9), 2147–56.
- Van Hamme, E., Desmarets, L., Dewerchin, H. L. & Nauwynck, H. J. (2011). Intriguing interplay between feline infectious peritonitis virus and its receptors during entry in primary feline monocytes. *Virus Research*, 160(1-2), 32–9.
- Vennema, H., de Groot, R. J., Harbour, D. A., Dalderup, M., Gruffydd-Jones, T., Horzinek, M. C. & Spaan, W. J. (1990). Early death after feline infectious peritonitis virus challenge due to recombinant vaccinia virus immunization. *Journal of Virology*, 64(3), 1407–9.
- Vennema, H., Poland, A., Foley, J. & Pedersen, N. C. (1998). Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses. *Virology*, 243(1), 150–157.
- Vennema, H. (1999). Genetic drift and genetic shift during feline coronavirus evolution. *Veterinary Microbiology*, 69, 139–141.
- Vermeulen, B. L., Devriendt, B., Olyslaegers, D. A., Dedeurwaerder, A., Desmarets, L. M., Favoreel, H. W. & Nauwynck, H. J. (2013). Suppression of NK cells and regulatory T lymphocytes in cats naturally infected with feline infectious peritonitis virus. *Veterinary Microbiology*, 164(1-2), 46–59.
- Vogel, L., Van Der Lubben, M., Te Lintelo, E. G., Bekker, C. P. J., Geerts, T., Schuijff, L. S., Grinwis, G. C. M., *et al.* (2010). Pathogenic characteristics of persistent feline enteric coronavirus infection in cats. *Veterinary Research*, 41(5), 12.
- Wang, Y.-T., Su, B.-L., Hsieh, L.-E. & Chueh, L.-L. (2013). An outbreak of feline infectious peritonitis in a Taiwanese shelter: epidemiologic and molecular evidence for horizontal transmission of a novel type II feline coronavirus. *Veterinary Research*, 44(1), 57.

- Watford, W. T., Moriguchi, M., Morinobu, A. & O'Shea, J. J. (2003). The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 14(5), 361–368
- Wiggans, K. T., Vernau, W., Lappin, M. R., Thomasy, S. M. & Maggs, D. J. (2013). Diagnostic utility of aqueocentesis and aqueous humor analysis in dogs and cats with anterior uveitis. *Veterinary Ophthalmology*, 1–9.
- Wondratschek, C., Weingart, C. & Kohn, B. (2010). Primary immune-mediated thrombocytopenia in cats. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 46(1), 12–9.
- Worthing, K. A., Wigney, D. I., Dhand, N. K., Fawcett, A., McDonagh, P., Malik, R. & Norris, J. M. (2012). Risk factors for feline infectious peritonitis in Australian cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 14(6), 405–12.
- Zhao, S. & Fernald, R. D. (2005). Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *Journal of Computational Biology: a Journal of Computational Molecular Cell Biology*, 12(8), 1047–64.
- Zu, S., Sola, I., Alonso, S. & Enjuanes, L. (2004). Sequence motifs involved in the regulation of discontinuous coronavirus subgenomic RNA synthesis. *Journal of Virology*, 78(2), 980–994.